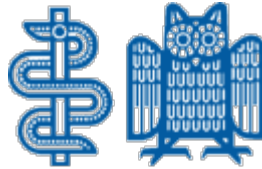


Aus dem Bereich Innere Medizin – Klinisch-Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. M. Böhm



**Eine Mutation des Myosin-bindenden Protein C bei der
hypertrophen Kardiomyopathie induziert mitochondriales H₂O₂
durch ein Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation
und Ca²⁺-induzierter Regeneration von NADPH**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Johannes Maximilian Bay
geb. am: 23.10.1987 in Homburg/ Saar

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Tag des Kolloquiums:

Berichterstatter:

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack, Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Herrn Dr. rer. nat. Alexander Nickel, Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.

Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 02.01.2019

(Johannes Maximilian Bay)

Sämtliche Messungen an isolierten Myozyten und Mitochondrien wurden von mir selbst nach Einarbeitung durch Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas und Herrn Dr. rer. nat. Alexander Nickel im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes (Direktor: Universitätsprofessor Dr. M. Böhm) durchgeführt.

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
1.1 Myosin binding protein C mutation in hypertrophic cardiomyopathy provokes mitochondrial H ₂ O ₂ by a mismatch between ADP-induced oxidation and Ca ²⁺ -induced regeneration of NADPH.....	1
1.2 Eine Mutation des Myosin-bindenden Proteins C bei der hypertrophen Kardiomyopathie provoziert mitochondriales H ₂ O ₂ durch ein Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Ca ²⁺ -induzierter Regeneration von NADPH.....	3
2. Einleitung	5
2.1 Ursachen und Klinik der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM).....	5
2.1.1. Definition der HCM	5
2.1.2 Epidemiologie der HCM	6
2.1.3 Ätiologie der HCM.....	7
2.1.4 Diagnostik und Therapie der HCM.....	11
2.2 Die elektromechanische Kopplung und Energetik in gesunden Herzmuskelzellen und HCM	13
2.2.1 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung	13
2.2.2 Mitochondriale Energetik in Herzmuskelzellen.....	15
2.2.3 Die Entstehung und Elimination von ROS in Mitochondrien.....	18
2.2.4 Die Auswirkung von vermehrter ROS-Bildung in Kardiomyozyten.....	22
2.2.5 Gleichgewicht von ADP-induzierter Oxidation und Ca ²⁺ -abhängiger Reduktion von NADH und NADPH in kardialen Mitochondrien.....	23
2.2.6 Vermehrter oxidativer Stress in Kardiomyozyten bei HCM.....	25
2.2.7 Struktur und Funktion des Myosin bindenden Protein C	26
2.2.8 Bedeutung der Mutation des Myosin bindenden Protein C in der Pathogenese der HCM.....	27
2.3 Fragestellung der Arbeit	31
3. Material und Methoden	33
3.1 Messung an isolierten Myozyten	33
3.1.1 Versuchstiere	33
3.1.2 Verwendete Substanzen	35
3.1.3 Myozytenisolation	44
3.1.4 Messanalagenaufbau und Messprotokoll	50
3.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe	70

3.1.6	Auswertung der Messungen an isolierten Myozyten	75
3.2	Messung an isolierten Mitochondrien	76
3.2.1	Mitochondrienisolation	76
3.2.2	Polarographische Atmungsmessungen an der Clark-Elektrode	78
3.2.3	Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien	79
3.2.4	Messung von mitochondrialen Superoxid.....	83
3.2.5	Fluorometrische Wasserstoffperoxidmessung m. Amplex® UltraRed-Assay	84
3.2.6	Auswertung der Messungen an isolierten Mitochondrien.....	86
4.	Ergebnisse	87
4.1	Fluoreszenz-/ Zellverkürzungsmessungen der Mybpc3-KI & Wildtyp Myozyten ...	87
4.1.1	Mortalitätsrate	87
4.1.2	Zellverkürzungsmessungen	88
4.1.3	Intrazelluläre Calciumkonzentrationen	94
4.1.4	Ermittlung des sarkomeren Längenintegrals	98
4.1.5	Intrazell.Natriumkonzentrationen der Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten	100
4.1.6	Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H/ NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD	102
4.1.7	Mitochondriales Membranpotential	104
4.1.8	Mitochondriale Superoxidproduktion	105
4.1.9	Mitochondriale H ₂ O ₂ Produktion	107
4.2	Messungen an isolierten Mybpc3-KI und Wildtyp Mitochondrien.....	110
4.3	Messungen mit dem Calciumsensitizer EMD 57033	113
5.	Diskussion	117
5.1	Rolle einer erhöhter Calciumsensitivität in Mybpc3 KI Myozyten und HCM	117
5.2	Rolle der mitochondrialen Dysfunktion in Mybpc3 KI Myozyten	120
5.3	Rolle des beschädigten Energiehaushalt in Mybpc3 KI Myozyten und HCM.....	122
5.4	Rolle der NNT in HCM	126
5.5	ROS und Arrhythmien in HCM.....	128
5.6	Neue Therapieansatzpunkte der HCM	132
5.7	Ausblick.....	135
5.8	Fazit	136
6.	Literaturverzeichnis	138
7.	Danksagung.....	160
8.	Publikationen und Vorträge.....	161
9.	Lebenslauf	164

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Ätiologien der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie.	11
Abbildung 2: Elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten und die Rolle der oxidativen Phosphorylierung.	15
Abbildung 3: Der Querbrückenzyklus der Myofibrille und die Rolle von ATP.	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung, der mitochondrialen Energetik, und ROS Produktion bzw. Elimination in Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen.	20
Abbildung 5: Energetisches Gleichgewicht im gesunden Herz.	25
Abbildung 6: Rolle der HCM assoziierten Genmutationen und strukturelle Pathophysiologie der HCM.	30
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung von makroskopisch und histologisch vergrößerten Myokard und erhöhter Calciumsensitivität der Mybpc3 Mäuse.	34
Abbildung 8: Darstellung der operativen Entnahme und der nachfolgenden Kanülierung der Herzen von analgosedierten Mäusen.	46
Abbildung 9: Gesamte Darstellung der Langendorff Perfusionsanlage und daran angeschlossenes Herz.	47
Abbildung 10: Einzeln dargestellte Myozyte unter 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Insgesamt längliche Gesamtform und sichtbare Querstreifung der Myofilamente.	48
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Calciumaufbaus im Rahmen der Myozytenisolation mit jeweils hinzugegebener Calciumchloridlösung und zwischenzeitlicher Ca^{2+} Konzentration.	49
Abbildung 12: Gesamter Messarbeitsplatz mit IonOptix Anlage. zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung.	52
Abbildung 13: Schematische Darstellung der IonOptix Anlage zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung.	53
Abbildung 14: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H /FAD.	55
Abbildung 15: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von SBFI.	56
Abbildung 16: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von Indo-1/TMRM ⁺ .	57
Abbildung 17: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von MitoSOX.	60
Abbildung 18: Schematische Darstellung des zu- und abführenden Leitungssystems und der Einbindung der präparierten Myozyten.	61
Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der Kalibrierung der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD.	65
Abbildung 20: Exemplarische Darstellung eines NAD(P)H und FAD Protokolls in IonWizard.	65
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung eines SBFI-Messprotokolls zur Aufzeichnung der intrazellulären Na^{+} -Konzentration mit Kalibrierung am Ende der Messung.	67
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung einer SBFI-Kalibrierung in Windows Excel. Das errechnete Signal der SBFI-Ratio wird durch die Messung der Kalibrierungslösungen mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen ermittelt.	67
Abbildung 23: Übersicht über die unterschiedlichen Parameter der Messprotokolle.	70
Abbildung 24: Messorte von NADH und FADH_2 als primäre Elektronenquelle an der Atmungskette und Indo-1.	71

Abbildung 25: Fluorezentrischer Messort von TMRM ⁺ , MitoSOX, DCF und Wirkung von Antimycin A in Mitochondrien.	74
Abbildung 26: Reaktionsgleichung an der Platinkathode und der Silberanode.	78
Abbildung 27: Schematischer Aufbau der Clark-Elektrode.	79
Abbildung 28: Schematischer Versuchsaufbau der Atmungsmessung isolierter Mitochondrien.	80
Abbildung 29: Exemplarisch dargestellte Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien mit finaler Oligomycin Konzentration 1,3 μ M.	82
Abbildung 30: Reaktionsgleichung der fluorometrischen Wasserstoffperoxidmessungen an isolierten Mitochondrien.	84
Abbildung 31: Sterblichkeitsraten der Myozyten von Wildtyp- und Mybpc3-Knock-In-Mäusen unter verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen.	88
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der während der Protokolle gemessenen Werte der Zellverkürzung und deren Messzeitpunkte.	89
Abbildung 33: Kontraktilität mit diastolischer und systolischer Sarkomerlänge und systolisch-fraktioneller Verkürzung in % vom Basalwert der Myozyten von WT und Mybpc3 KI.	90
Abbildung 34: Mittelwerte der Sarkomerlängen von WT und Mybpc3-KI Myozyten unter Kontraktion von 0,5 Hz + NT und 5 Hz + Isoprenalin von WT.	91
Abbildung 35: Zeitdauer bis zur maximalen Kontraktion (Time to peak in Sekunden) und Zeitspanne bis zur 50% und 90%-igen Relaxation vom Maximalwert der Verkürzungsamplitude (Relaxationszeit/ Relaxationtime RT) von Myozyten der WT und Mybpc3-KI.	92
Abbildung 36: Zytosolische Calciumkonzentrationen der WT und Mybpc3-KI Myozyten als Mittelwerte der Amplituden und in Systole und Diastole.	94
Abbildung 37: Patch-Clamp-Daten des mitochondrialen Ca ²⁺ -Einstroms (oben-links), der mitochondrialen [Ca ²⁺] _m und zytosolischen [Ca ²⁺] _c Calciumkonzentrationen und dem Verhältnis [Ca ²⁺] _m / [Ca ²⁺] _c der Myozyten von WT und Mybpc3-KI.	96
Abbildung 38: Zeit bis zur sarkomeren 50- bzw. 90%igen Wiederausdehnung der WT und Mybpc3-KI Myozyten als Mittelwerte und Zeit bis zur 50- bzw. 80%igen Abnahme des zytosolischen [Ca ²⁺] _c der WT und Mybpc3-KI.	97
Abbildung 39: Sarkomeres Längenintegral und dessen Auftragung gegen die zytosolischen Calciumkonzentrationen der Myozyten von WT und Mybpc3-KI.	99
Abbildung 40: Freies, intrazelluläres Na ⁺ der WT und Mybpc3-KI Myozyten.	101
Abbildung 41: Verlauf des Redoxstatus der Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten unter Hinzugabe von Isoprenalin und Frequenzerhöhung (grauer Bereich).	102
Abbildung 42: Ratiometrische Darstellung der Autofluoreszenzverhältnisse von NAD(P)H und FAD der Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten.	103
Abbildung 43: Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten.	104
Abbildung 44: Mitochondriale Superoxidproduktion der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten, gemessen mit Hilfe von MitoSOX.	106
Abbildung 45: Mitochondriale H ₂ O ₂ -Produktion der Mybpc-KI und Wildtyp Myozyten. ...	108
Abbildung 46: Wechselwirkung zwischen mitochondrialem Redoxstatus und H ₂ O ₂ -Akkumulation der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten.	109
Abbildung 47: Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von Mybpc3 und Wildtyp Myozyten in An- und Abwesenheit von ADP (State 2 und State 3) und Respirationsquotient (RQ) der Mitochondrien.	110
Abbildung 48: Mitochondriale Superoxid- und H ₂ O ₂ Produktion in isolierten Mitochondrien der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten.	112

Abbildung 49: Membranpotential der isolierten Mitochondrien von Mybpc3-Knock-In und Wildtyp in Abhängigkeit der Anwesenheit von Pyruvat/ Malat (P/M), ADP, und DNP/ Oligomycin.	113
Abbildung 50: Zelllänge und Zellverkürzung unter unterschiedlichen EMD Konzentrationen. Diastolische und systolische intrazelluläre Calciumkonzentration unter unterschiedlichen EMD-Konzentrationen..	114
Abbildung 51: Autofluoreszenzen von NADH und FAD in Abhängigkeit zur EMD Konzentration 0 μ M, 0,3 μ M, 3 μ M und 30 μ M.....	115
Abbildung 52: NAD(P)H und FAD Redoxstatus bei unterschiedlichen EMD-Konzentrationen..	116
Abbildung 53: Schematische Darstellung der mitochondrialen Energetik, elektromechanischen Kopplung und ROS Produktion bzw. Elimination in Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen und bei HCM.	125
Abbildung 54: Energetisches Gleichgewicht im gesunden Herzen und Imbalance bei HCM.	126
Abbildung 55: Favorisierter Rückwärtsmodus der NNT bei HCM und energetische Auswirkungen des Vorwärts- und des Rückwärtsmodus der NNT unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.....	127
Abbildung 56: Häufigkeitsrate von Arrhythmien zwischen WT und Mybpc3-Knock-In-Myozyten.....	130
Abbildung 57: Konzept der HCM-Pathogenese mit entstehenden Signalkaskaden und möglichen Therapieansatzpunkten.	135

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AfCS	Alliance for Cellular Signaling
ATP	Adenosin-Triphosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Aqua dest.	destilliertes Wasser
β -AR	beta-Adrenozeptor
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$	zytosolische Calciumkonzentration
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$	mitochondriale Calciumkonzentration
CCD	charge-coupled device; lichtempfindlicher Chip zur Datenspeicherung
CD	Cathepsin D
CN	Zyanid
Cre	Rekombinase, Typ I Topoisomerase eines P1 Bacteriophagens
$\Delta\Psi_{\text{m}}$	mitochondriales Membranpotential
DCLP	Dichroic long pass
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMD	Ca^{2+} Sensitizer EMD 57033 (EMD)
ETC	electronic transport chain (Atmungskette)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH_2	reduzierte Form von FAD^{+}
FCCP	Carbonylzyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
GSH	Glutathion
h	Stunde
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy (Hypertrophe Kardiomyopathie)
Hz	Hertz (1/s)

HZV	Herzzeitvolumen
I _{Ca}	Calciumeinstrom
Indo-1, AM	Fluoreszenzfarbstoff und Calciumindikator, Acetoxymethylester
Iso	Isoprenalin
K ⁺	Kalium
Knock-In	KI
λ	Wellenlänge
mNCE	mitochondrialer Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
MCU	Mitochondrialer Calcium Uniporter
MG	Molekulargewicht
MHC	schwere Kette des Myosins
MAP-K	MAP-Kinase
Mybpc3	myosin-binding protein C (Myosin-bindendes Protein C)
mNCE	mitochondrialer Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
min	Minuten
mol	Molar
mmol	Millimolar
µmol	Mikromolar
nmol	Nanomolar
Mn-SOD	Manganhaltige Superoxid Dismutase
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
MG	Molekulargewicht
MHC	Schwere Kette des Myosins
n	Anzahl der Experimente (bzw. Anzahl der Zellen)
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-H ⁺ H ⁺
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-H ⁺ H ⁺
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NNT	Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase
NT	Normaltyrode

$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidanionen-Radikal
p	p-Wert, Signifikanzwert
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMT	Photomultiplier
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Relaxationszeit
s, ms	Sekunden, Millisekunden
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SERCA	SR- Ca^{2+} -ATPase
TMRM ⁺	Tetramethylrhodamin-methylester
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

1.1 Myosin binding protein C mutation in hypertrophic cardiomyopathy provokes mitochondrial H_2O_2 by a mismatch between ADP-induced oxidation and Ca^{2+} -induced regeneration of NADPH

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common inherited cardiac disease and is frequently caused by mutations in sarcomeric proteins, in particular of the cardiac myosin-binding protein C (Mybpc3). Many mutations have in common that they increase myofilament Ca^{2+} sensitivity, typically inducing diastolic dysfunction. While Ca^{2+} sensitization of the myofilaments explains diastolic dysfunction, it is incompletely resolved how these mutations induce cardiac hypertrophy and arrhythmias. Reactive oxygen species (ROS) are involved in the pathophysiology of hypertrophy and arrhythmias, and an important ROS source are mitochondria. Elimination of H_2O_2 (but not $\cdot\text{O}_2^-$) in mitochondria is governed by enzymes that require NADPH, which is in equilibrium with NADH and regenerated by the Krebs cycle. Here, we show that HCM mutations that increase myofilament Ca^{2+} sensitivity generate bioenergetic mismatch and oxidative stress during β -adrenergic stimulation.

An elevation of work *per se* induces oxidation of NAD(P)H, since ADP accelerates the donation of electrons to the ETC by NADH. Physiological elevations of cardiac work are mediated by β -adrenergic stimulation, which increases cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) transients and mitochondrial Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) accumulation. Elevated $[\text{Ca}^{2+}]_m$ stimulates the Krebs cycle, accelerating NAD(P)H regeneration to equilibrate its redox state. Since myofilament Ca^{2+} hypersensitivity, as seen in HCM, induces contraction (and thus, work) at lower $[\text{Ca}^{2+}]_c$, we hypothesized that this creates an imbalance between ADP-induced oxidation and Ca^{2+} -dependent regeneration of NAD(P)H, favoring mitochondrial H_2O_2 emission. The ensuing overflow of ROS from mitochondria then causes arrhythmias. For any given sarcomere shortening that produces work and consumes ATP, less Ca^{2+} stimulates the Krebs cycle to maintain mitochondrial NADH. This mismatch reverses the mitochondrial transhydrogenase (NNT) to regenerate NADH from NADPH, supporting ATP production at the cost of NADPH-dependent antioxidative capacity.

Cardiac myocytes were isolated from a Mybpc3-targeted Knock-In mouse model (KI) carrying a point mutation frequently associated with HCM and increased myofilament Ca^{2+} sensitivity, and wild-type littermates (WT). Myocytes were exposed to a protocol that simulates a physiological increase in workload by applying the β -adrenergic agonist isoprenaline (10 nM) and increasing the (electrical field-) stimulation frequency from 0.5 to 5 Hz for 1 min (Iso/5Hz). During this protocol, the redox states of NAD(P)H/NAD(P)⁺ and FADH₂/FAD were determined within the same cells by their autofluorescences, respectively (WT, n=25; KI, n=20). Furthermore, fluorescence of the superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) indicator MitoSOX (n=24/25) or the H_2O_2 indicator DCF (n=43/25) were monitored, and sarcomere length/shortening was recorded. Finally, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and $[\text{Ca}^{2+}]_m$ were monitored simultaneously by a patch-clamp based protocol (performed by Dr. M. Kohlhaas) with similar conditions (n=14/9).

As predicted by increased myofilament Ca^{2+} sensitivity, diastolic sarcomere length was shorter in KI compared to WT myocytes, and after iso/5Hz, systolic sarcomere shortening increased more in KI than in WT ($p < 0.0001$, respectively). In contrast, no differences in diastolic and systolic $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and $[\text{Ca}^{2+}]_m$ nor in the efficacy of mitochondrial Ca^{2+} uptake were observed, as indicated by the ratio of $[\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_c$. Redox states of NAD(P)H/NAD(P)⁺ and FADH₂/FAD were slightly more oxidized at baseline in KI vs. WT myocytes, which was aggravated after Iso/5Hz ($p < 0.05$). While mitochondrial $\cdot\text{O}_2^-$ formation was similar, H_2O_2 emission increased in KI compared to WT myocytes during redox state oxidations in response to Iso/5Hz ($p < 0.05$). In contrast to WT myocytes, KI myocytes did not survive an extended 3-min protocol of Iso/5Hz.

In conclusion, we discovered a novel mechanism by which increased Ca^{2+} sensitivity of myofilaments in HCM induces mitochondrial ROS emission during β -adrenergic stimulation by a mismatch between ADP-induced oxidation and Ca^{2+} -induced regeneration of the mitochondrial redox state. This mechanism may play an important pathophysiological role for the development of hypertrophy and arrhythmias in HCM.

(Teile der englischen Zusammenfassung wurden bereits als Kongressbeitrag beim Heart Failure Association Winter Meeting 2014 in Les Diablerets publiziert, siehe bei Publikationen/ Vorträge)

1.2 Eine Mutation des Myosin-bindenden Proteins C bei der hypertrophen Kardiomyopathie provoziert mitochondriales H_2O_2 durch ein Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Ca^{2+} -induzierter Regeneration von NADPH

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste hereditäre Herzerkrankung und wird meistens durch Mutationen in den für die Sarkomerproteine kodierenden Genen verursacht, insbesondere des Myosin-bindenden Proteins C (Mybpc3). Während vermehrte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente die diastolische Dysfunktion erklärt, ist es allerdings unvollständig geklärt, wie diese Mutationen kardiale Hypertrophie und Arrhythmien induzieren. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in die Pathophysiologie der Hypertrophie und Arrhythmien involviert, und Mitochondrien sind die Hauptquelle von ROS. Die Eliminierung von H_2O_2 (aber nicht $\cdot\text{O}_2^-$) in Mitochondrien wird durch Enzyme reguliert, die NADPH benötigen, welches im Gleichgewicht mit NADH steht und durch den Citratzyklus regeneriert wird. Hier zeigen wir, dass HCM Mutationen, die die myofilamentäre Ca^{2+} -Sensitivität erhöhen, bioenergetisches Ungleichgewicht und oxidativen Stress während einer β -adrenergen Stimulation erzeugen.

Eine Erhöhung der Arbeitslast *per se* induziert die Oxidation von NAD(P)H, da ADP die Abgabe von Elektronen an die Atmungskette fördert. Eine physiologische Erhöhung der kardialen Arbeit wird durch β -adrenerge Stimulation vermittelt, die die zytosolischen Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) Transienten und mitochondriale Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) Akkumulation erhöht. Gesteigertes $[\text{Ca}^{2+}]_m$ stimuliert den Citratzyklus und beschleunigt die NAD(P)H Regeneration, um den Redox-Status auszugleichen. Die bei HCM erhöhte myofilamentäre Ca^{2+} -Sensitivität führt zu einer verstärkten Kontraktion und damit Arbeit bei niedrigeren oder gleichen $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Folglich spekulieren wir, dass dieser Umstand ein Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Ca^{2+} -abhängiger Regeneration von NAD(P)H entstehen lässt, welches die mitochondriale H_2O_2 Emission begünstigt. Die darauffolgende mitochondriale Überproduktion von ROS könnte dann kardiale Arrhythmien verursachen. In Folge jeder einzelner Sarkomerverkürzung, die Arbeit produziert und ATP verbraucht, stimuliert weniger Ca^{2+} den Citratzyklus, um NADH zu regenerieren. Dieses Ungleichgewicht dreht die Reaktionsrichtung der mitochondrialen Transhydrogenase (NNT) um, mit dem Ziel, das benötigte NADH aus NADPH zu regenerieren - die ATP-Produktion wird somit auf Kosten der antioxidativen Kapazität gefördert.

Kardiale Myozyten wurden aus einem Mausmodell mit genetischem Knock-In (KI) einer beim Menschen vorkommenden Mutation des *Mybpc3* Gens isoliert, die eine gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente verursacht. Als Kontrolle dienten gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere. Die Myozyten wurden einem Protokoll ausgesetzt, das einen physiologischen Arbeitslastanstieg durch Anwendung des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (10 nM) und Zunahme der elektrischen Feldstimulationsfrequenz von 0,5 auf 5 Hz für eine Minute simulierte (Iso/5Hz). Während dieses Protokolls wurde der mitochondriale Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)^+ und FADH_2/FAD anhand der entsprechenden Autofluoreszenzen aufgezeichnet (WT, n=25; KI, n=20). Darüber hinaus wurde die Fluoreszenz des Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$)-Indikators MitoSOX (n=24/25) und des H_2O_2 -Indikators DCF (n=43/25) beobachtet und darüber hinaus die Länge und die Verkürzung der Sarkomere aufgezeichnet. Am Ende wurden $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $[\text{Ca}^{2+}]_m$ gleichzeitig anhand eines Patch-Clamp-basierten Protokolls unter ähnlichen Voraussetzungen aufgezeichnet (durch Dr. M. Kohlhaas; n=14/9).

Bedingt durch die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente war die diastolische Sarkomerlänge kürzer bei den KI im Vergleich zu den Wildtyp Myozyten. Nach Iso/5Hz nahm die Sarkomerverkürzung der KI stärker zu als die der WT ($p < 0.0001$). Im Gegensatz hierzu wurden weder Unterschiede zwischen diastolischem und systolischem $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $[\text{Ca}^{2+}]_m$, noch in der Wirksamkeit der mitochondrialen Ca^{2+} Aufnahme festgestellt, abgebildet in dem Verhältnis von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Der mitochondriale Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)^+ und FADH_2/FAD war zu Beginn leicht oxidiert bei den KI verglichen mit den WT Myozyten, was sich nach Iso/5Hz weiter verstärkte ($p < 0.05$). Im Gegensatz zu den WT Myozyten überlebten die KI Myozyten kein verlängertes 3-Minuten Protokoll von Iso/5Hz.

Zusammenfassend haben wir einen neuen Mechanismus entdeckt, bei dem durch die gesteigerte Ca^{2+} -Sensibilität der Myofilamente bei HCM mitochondriale ROS-Produktion während β -adrenerger Stimulation induziert wird. Dies geschieht durch ein Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Ca^{2+} -induzierter Regeneration des mitochondrialen Redoxstatus. Dieser Mechanismus könnte eine wichtige pathophysiologische Rolle in der Entstehung von Hypertrophie und Arrhythmien bei der HCM spielen.

2. Einleitung

2.1 Ursachen und Klinik der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM)

2.1.1. Definition der HCM

Als häufigste hereditäre Herzerkrankung stellt die HCM eine wesentliche Unterform des großen klinischen Bilds der Herzinsuffizienz dar. Innerhalb der großen Gruppe der diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen nimmt die HCM einen entscheidenden Anteil in der Ätiologie ein (Herold et al, 2014).

Pathophysiologie	Ätiologie
Systolische Ventrikelfunktionsstörung	Kontraktionsschwäche <ul style="list-style-type: none"> - Koronare Herzerkrankung - Dilatative Kardiomyopathien - Myokarditis
	Erhöhte Ventrikelwandspannung <ul style="list-style-type: none"> - Vitien - Arterielle Hypertonie - Pulmonale Hypertonie
Diastolische Ventrikelfunktionsstörung	Herzhypertrophie <ul style="list-style-type: none"> - Arterielle Hypertonie
	Behinderung der Ventrikelfüllung <ul style="list-style-type: none"> - Konstriktive Perikarditis - Restriktive Kardiomyopathien - Hypertrophe Kardiomyopathien - Herzbeuteltamponade
Herzrhythmusstörungen	

Tabelle 1: Pathophysiologische Einteilung der Herzinsuffizienz und Anteil der HCM (Modifiziert nach Herold et al. 2017).

Die HCM ist als eine, in Relation zu einer eventuell vorhandenen Nachtlasterhöhung, unverhältnismäßige Hypertrophie des linken, gelegentlich aber auch des rechten Ventrikels definiert, für die keine definitive Ursache wie beispielsweise eine arterielle Hypertonie gefunden werden kann. Insbesondere betrifft sie dabei den Septumbereich (asymmetrische Septumhypertrophie). Die erhöhte linksventrikuläre Wanddicke lässt sich folglich nicht durch einen pathologischen Füllungsdruck des linken Ventrikels (LV) erklären. Diese Definition gilt sowohl für Kinder als auch Erwachsene und bezieht sich zunächst weder auf eine mögliche Pathophysiologie, noch lässt sie eine wesentliche Aussage über die Erkrankungsätiologie zu. (Guidelines for HCM, 2014). Kennzeichnende phänotypische Merkmale der HCM sind eine verdickte Ventrikelwand, eine Beeinträchtigung der LV Funktion, eine übermäßige Kraftentwicklung der Myozyten, eine gestörte Relaxationskinetik und eine morphologische Größenzunahme der Kardiomyozyten (Haldar and Srivastava, 2016).

Funktionell wird die HCM in eine häufigere obstruktive Form (HOCM, 70 %) und eine seltenere nichtobstruktive Form (HNCM, 30 %) eingeteilt. Eine einstimmige Einteilung der HCM stellt sich entsprechend schwierig dar und ist nach wie vor Gegenstand fachmedizinischer Diskussionen. Die American Heart Association empfiehlt inzwischen, die HCM unter genetischen Aspekten einzuteilen, während sich europäische Arbeitsgruppen nach wie vor für eine morphologische Klassifikation aussprechen (Prinz et al., 2011).

2.1.2 Epidemiologie der HCM

In unserer westlichen Gesellschaft stellt die HCM die häufigste vererbte Form der Herzinsuffizienz dar und besitzt im Erwachsenenalter eine Prävalenz von ca. 0,2% (Guidelines for HCM, 2014; Frey et al., 2012; Watkins et al., 2011), wohingegen die genaue Prävalenz der HCM im Kindesalter bisher nicht bekannt ist. Schätzungsweise wird allerdings von einer jährlichen Inzidenz von 0,3–0,5 Fällen /100.000 Kinder (Spanne: 0,005–0,07%) ausgegangen. Ein Großteil der klinischen Studien berichtet ein leichtes Übergewicht des männlichen Geschlechts bei HCM. In Abhängigkeit zu den jeweils unterschiedlichen Ethnien stellt sich die Prävalenz der HCM nahezu ähnlich dar (Guidelines for HCM, 2014). Mit einer Inzidenz von 19/100.000/Jahr und einer Prävalenz von 1:500 stellt die HCM die häufigste

Ursache des mit ventrikulären Arrhythmien assoziierten plötzlichen Herztods bei jungen Erwachsenen bis 35 Jahren dar und tritt nicht selten als Erstmanifestation der HCM auf (Gersh et al., 2011; Maron et al., 2003a; Maron et al., 1996; Vakrou and Abraham, 2014). Vor allem Belastungs-induzierte Arrhythmien gelten dabei als wesentliche Auslöser des plötzlichen Herztods bei HCM (Vakrou and Abraham, 2014). Die allgemeine Mortalität von HCM Patienten liegt bei ungefähr 1% im Jahr (Spirito et al., 2014).

2.1.3 Ätiologie der HCM

Die HCM entsteht zum größten Teil durch Mutationen der für die sarkomerischen Proteine kodierenden Genregionen. Die meisten dieser Mutationen enden in ihrer Konsequenz in einer erhöhten Ca^{2+} Affinität der Myofilamente und darüber hinaus in einer pathologisch erhöhten Kontraktilität und diastolischen Dysfunktion (Ho et al., 2002). Über welche genauen Mechanismen diese beschriebenen Mutationen letztendlich die linkventrikuläre Hypertrophie und zum Teil auch Arrhythmien verursachen, ist bislang nicht geklärt. Denn obwohl viele zu Grunde liegenden Mutationen ausgemacht wurden, konnte bisher kein relevanter pharmakologischer Therapieansatz entwickelt werden, der die langfristige Prognose der HCM beeinflussen würde (Watkins et al., 2011).

Bereits vor über 20 Jahren wurden die ersten Mutationen tragenden Genabschnitte, die eine HCM auslösen können, entdeckt. Seitdem wurde die HCM in vielerlei Hinsicht als eine Erkrankung der Sarkome deklariert (Watkins et al., 2011). Dabei sind inzwischen über 1.400 verschiedene Mutationen auf über 27 Genloci beschrieben.

Bis zu 60% der heranwachsenden und erwachsenen HCM Patienten besitzen einen autosomal-dominanten familiären Erbgang mit variabler Penetranz und typischen Mutationen in den für die kardialen Sarkomerproteine kodierenden Genen. Lediglich 5 bis 10% der beschriebenen Fälle bei Erwachsenen werden durch andere genetische Störungen, wie angeborene metabolische und neuromuskuläre Erkrankungen, Chromosomenanomalien und genetische Syndrome ausgelöst. Seltener wird die HCM durch nichtgenetische Erkrankungen, die eine genetische Form der Erkrankung imitieren, verursacht (Guidelines for HCM, 2014) .

Bisher ist bekannt, dass die HCM durch Mutationen von Genen, die für die kontraktilen Proteine der Myofibrille kodieren, ausgelöst werden. Mit einem Anteil von zwei Dritteln betreffen diese Mutationen vor allem die Gene, die für das kardiale Myosin-bindende Protein C (Mybpc3, cMyBPC), die β -Myosin schweren Ketten (MYH7, β -MHC) und das kardiale Troponin T (TNNT2, cTnT) kodieren (Guidelines for HCM, 2014).

Das Myosin-bindende Protein C (Mybpc3) nimmt dabei mit bis zu 40% einen Großteil der zu Grunde liegenden Genmutationen ein und ist als ein modulares Protein mit 11 Domänen beschrieben, welche bereits in den 1970er Jahren als Bestandteil der quergestreiften Muskulatur entdeckt wurde (Bennett et al., 1999; Winegrad, 1999). Sowohl in den gesunden Muskelgeweben als auch unter pathophysiologischen Situationen spielt Mybpc3 folglich eine entscheidende Rolle in der kontraktilen Regulation (Moolman-Smook et al., 2003). Die HCM tritt in 50% der Fälle familiär auf, andernfalls wird eine Neumutation angenommen (Bos et al., 2009). Der klinische Phänotyp kann dabei selbst bei identischer Mutation zweier Patienten sehr variabel auftreten (Seidman and Seidman, 2011). Bislang wurde eine präzise Verbindung zwischen den jeweils auftretenden Mutationen und ihrer biophysikalischen Konsequenzen (Genotyp-Phänotyp-Korrelation) nicht explizit entdeckt (Watkins et al., 2011), denn ein phänotypisches Ausprägungsbild konnte bis dato nicht auf ein spezifisches Gen oder eine Mutation bezogen werden. Dementsprechend unterliegt die HCM nicht ausschließlich der jeweils verursachenden Genmutation. Konsekutiv präsentiert sich das Krankheitsbild der HCM sehr variabel in seiner klinischen Ausprägung wie den Symptomen, dem Hypertrophieausmaß und dem Risiko des plötzlichen Herztods (Moolman-Smook et al., 2003). Weiterhin bleiben in ca. 25-30% der Fälle die auslösenden Mutationen bzw. die zu Grunde liegenden Ursachen der HCM unbekannt (Seidman and Seidman, 2011). In den letzten Jahren lag der Hauptfokus von HCM-Studien vorrangig auf der Verteilung von bekannten Mutationen innerhalb bestimmter Erkrankungspopulationen und nicht mehr auf der Entdeckung neuer Gene und weiterer für die Erkrankung verantwortlicher Mutationen (Arad et al., 2002). Diverse Arbeiten konnten bisher zeigen, dass verschiedene Punktmutationen im gleichen Sarkomerprotein entweder die HCM oder die andere große Gruppe der Kardiomyopathien, die dilatative Kardiomyopathie (DCM), verursachen können. Ein gemeinsamer kodierender Genbereich, der durch Mutationen verändert werden kann, besteht demnach zwischen den beiden Erkrankungsbildern nicht (Halдар and Srivastava, 2016).

Erwähnenswert bleibt, dass auch im Falle der HCM verschiedene Risikofaktoren und Umwelteffekte wie vorrangig die arterielle Hypertonie, die koronare Herzkrankheit und die Hyperlipidämie, aber auch Alter und Trainingszustand in der Entstehung und letztlich auch Ausprägung des Phänotyps eine nicht unbeachtliche Rolle spielen (Watkins et al., 2011; Wilder et al., 2015).

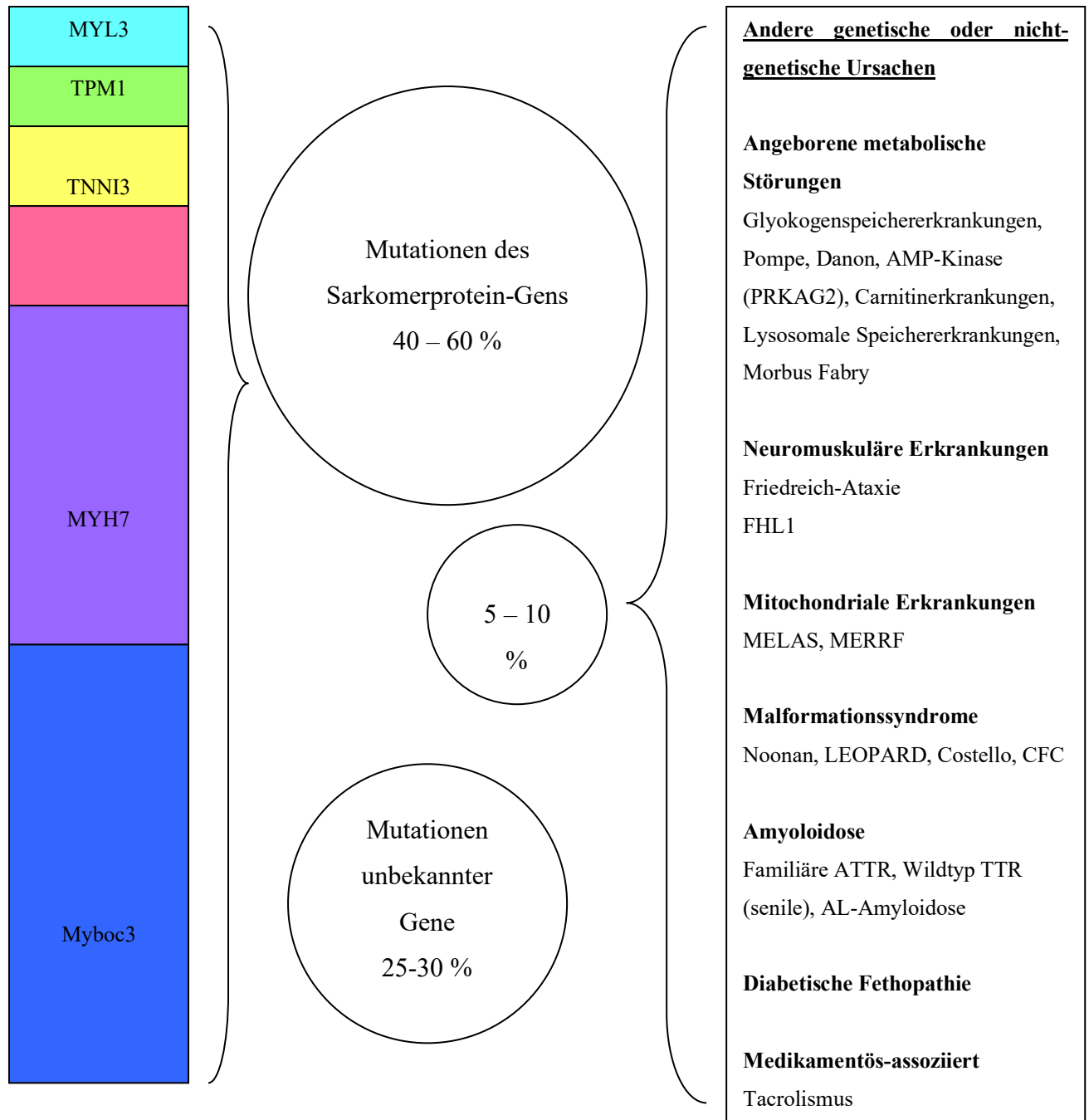


Abbildung 1: Verschiedene Ätiologien der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie, modifiziert nach „Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy“, Guidelines for HCM, 2014.

AL-Amyloidose = Leichtketten (amyloid light chain)-Amyloidose; ATTR = Transthyretin-Amyloidose; CFC = Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome; FHL 1 = Four and a half LIM domains protein 1; MELAS = mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und Schlaganfall-ähnlichen Episoden; MERRF-Syndrom (myoclonic epilepsy with ragged red fiber) = mitochondriale Myopathie mit einer klonischen Muskelspastik, epileptischen Anfällen, Kleinhirn-Ataxie; MYBPC3MYBPC3MYBPC3 = myosin-binding protein C, cardiac type; MYH7 = myosin, heavy chain 7; MYL3 = myosin light chain; TNNT2 = kardiales Troponin I; TNNT2 = kardiales Troponin T; TPM1 = Tropomyosin 1 alpha chain; TTR = Transthyretin.

2.1.4 Diagnostik und Therapie der HCM

Pathognomonisch für die HCM ist die übermäßige Verdickung bzw. Hypertrophie des linken Ventrikels und die daraus resultierende Unfähigkeit des Myokards, sich angemessen in der Diastole zu entspannen (sog. Relaxation), welche wiederum in der diastolischen Dysfunktion endet (Guidelines for HCM, 2014; Frey et al., 2012; Watkins et al., 2011).

Charakteristisch für das klinische Verlaufsbild der HCM ist, dass die Pumpfunktion oft über Jahre noch in normalen Referenzbereichen liegt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Ejektionsfraktion („Heart-failure with preserved ejection fraction“ - HFpEF). Bei erstmaliger Diagnosestellung ist der Grad der Hypertrophie und der Fibrosierung, die letztendlich zur diastolischen Dysfunktion führen, zumeist schon weit fortgeschritten (Guidelines for HCM, 2014). Das klinische Bild der HCM stellt sich dementsprechend sehr heterogen dar. Während manche Patienten eine normale Lebenserwartung ohne Auftreten von Symptomen erreichen, enden andere in einer frühzeitigen terminalen Herzinsuffizienz im jungen Alter. Ausmaß und Lokalisation der typischen Wandverdickung sind darunter sehr variabel. In Abhängigkeit von der linksventrikulären Morphologie ist eine dynamische Obstruktion mit Ausbildung eines intrakavitären systolischen Druckgradienten möglich.

Auf histologischer Ebene lassen sich pathognomonisch sog. „fiber disarray“ nachweisen, eine Fehlanordnung von Kardiomyozyten, worunter es zu verzweigten Anordnungen der auf bis zu 100 µm verdickten Kardiomyozyten mit einhergehender Fibrose kommt. Diese reaktiven Umbauprozesse, und die daraus entstehende typische myokardiale Hypertrophie, werden

vielerlei als Kompensationsmechanismen gedeutet, um der drohenden kontraktile Dysfunktion zunächst vorzubeugen (Maron et al., 1998; Maron and Roberts, 1979). In etwa die Hälfte aller HOCM Patienten zeigen eine relevante Obstruktion nur unter entsprechender Provokation. Neben der Basisdiagnostik mit körperlicher Untersuchung, Elektro- und Echokardiographie werden dementsprechend auch weiterführende Diagnostika wie Koronarangiographie, Laevographie und Spirometrie unter Belastung empfohlen.

Aufgrund der Wertigkeit molekulargenetischer Faktoren in der Ätiopathogenese empfehlen aktuelle Leitlinien bei Patienten mit HCM derzeit eine kardiologische Basisdiagnostik von Verwandten ersten Grades. Sofern keine Gendiagnostik möglich ist, sollte zwischen dem 12. und 18. Lebensjahr jährlich und nach dem 18. Lebensjahr fünfjährlich echokardiographisch untersucht werden (Maron et al., 2003b).

Bisher richten sich die derzeitigen Therapieempfehlungen nach Beobachtungsstudien oder Fallserien, da größere randomisierte Studien aufgrund der niedrigen Prävalenz der HCM nicht existieren. Neben allgemeinen Maßnahmen wie Ausdauersport im aeroben Bereich und dem Verzicht auf Noxen wie Alkohol und Nikotin steht bei der HNCM bei erhaltener systolischer Pumpfunktion vor allem die symptomatische medikamentöse Therapie entsprechend einer spezifischen Herzinsuffizienztherapie im Vordergrund. Im Falle der HOCM hingegen bestehen aufgrund einer potentiellen weiteren Verschlimmerung der Ausflusstraktobstruktion strenge Kontraindikationen für bestimmte vor- oder nachlastsenkende Medikamente wie zum Beispiel Nitrate, ACE-Hemmer, Calciumantagonisten vom Nifedipin-Typ und zudem positiv inotrop wirkende Substanzen wie Digitalispräparate. Hinsichtlich der einhergehenden diastolischen Dysfunktion haben Medikamente Vorrang, die durch Verlängerung des diastolischen Intervalls die linksventrikuläre Füllung positiv beeinflussen, wie beispielsweise primär Betablocker (Thompson et al., 1980) oder alternativ Calciumantagonisten vom Verapamil-Typ (Wigle, 1995). Die bei der HOCM zudem weiter erscheinenden Therapieoptionen mit chirurgischer Myektomie oder septaler Alkoholablation sind nach aktueller Expertenansicht als gleichwertig anzusehen (Prinz et al., 2011).

Patienten, die an HCM erkranken, sollten aufgrund des epidemiologisch raren Auftretens und der komplexen Hämodynamik in spezialisierten Zentren behandelt werden. Neue Therapiemöglichkeiten zielen derzeit, neben der Langzeitbeobachtung, vordergründig auf

eine bestmöglich frühzeitige Risikostratifizierung bei Patienten ab, beispielsweise durch Etablierung neuerer bildgebender Verfahren wie MRT oder CT. Medikamente, die Bezug auf die spezielle Pathophysiologie der HCM nehmen, konnten bisher nicht entwickelt werden.

2.2 Die elektromechanische Kopplung und Energetik in gesunden Herzmuskelzellen und HCM

2.2.1 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung

Bei der elektromechanischen Kopplung im Herzen nimmt Calcium (Ca^{2+}), beginnend von der initialen elektrischen Erregung bis hin zur letztendlichen Kontraktion der Myozyten, eine ganz entscheidende Rolle ein (Bers, 2002). Beim Ablauf eines Aktionspotentials kommt es zunächst zur Aktivierung von spannungsabhängigen Natrium (Na^+) Kanälen. Der hierdurch entstehende nach intrazellulär gerichtete Na^+ -Strom führt in der Folge zur raschen Depolarisation der Zellmembran und ferner zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (LTCC) in der Zellmembran. Der dadurch entstandene Ca^{2+} -Einstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) löst innerhalb von weniger als einer Millisekunde die Öffnung der Ca^{2+} -Ryanodinrezeptoren des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) aus, das in enger Nachbarschaft zur den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen der Zellmembran liegt (Scriven et al., 2000). Dieser als „ Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung“ deklarierte Mechanismus (Fabiato, 1983) führt zum weiteren Anstieg von Ca^{2+} im Zytosol. Dieses zytosolische Ca^{2+} bindet an Troponin C und aktiviert letztendlich die Kontraktion der Myofilamente (Bers, 2002).

Während der Diastole wird Ca^{2+} über die SR Ca^{2+} ATPase (SERCA) wieder in das SR überführt, während der größere Teil des über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (LTCCs) eingeflossenen Ca^{2+} primär über den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) nach extrazellulär transportiert wird, der ein Ca^{2+} gegen drei Na^+ Ionen austauscht. Die Relaxation der Kardiomyozyten ist also eng mit dem Abfall von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ assoziiert, welcher durch zwei wesentliche Transportmechanismen gewährleistet wird – die SERCA und der NCX. Die

Funktion des NCX ist dabei eng mit der sarkolemmalen Na^+/K^+ -ATPase (NKA) verbunden, die überwiegend durch glykolytisches ATP angetrieben wird (Glitsch and Tappe, 1993) und drei Na^+ Ionen im Tausch gegen zwei K^+ Ionen ausschleust (Despa and Bers, 2013). In Kardiomyozyten von Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen werden 70% des zytosolischen Ca^{2+} Erhöhung durch die Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR erbracht, während sich der Anteil des trans-sarkolemmalen Ca^{2+} Einstroms auf lediglich 30% beläuft (Bers, 2008). In Mäusen und Ratten hingegen verschiebt sich dieses Verhältnis weiter in Richtung SR mit einer Relation von ca. 90/10 (SR/LTCC). Das Zusammenspiel der LTCCs und der Ryanodinrezeptoren des SR (RyRs) stellen dabei das wesentliche Ausgangsmuster für die sogenannten „ Ca^{2+} Mikrodomänen“ innerhalb der Zelle dar, unter denen über ein kurzes Zeitintervall sehr hohe Konzentrationen von Ca^{2+} entstehen, die wiederum über den gleichen Ort der vorherigen Freisetzung wieder verschwinden oder durch intrazelluläre Komponenten abgebaut werden (Rizzuto and Pozzan, 2006). Die Ca^{2+} Mikrodomänen tragen damit einen wesentlichen Anteil zur wirksamen Kopplung zwischen den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und Ryanodinrezeptoren bei und unterstützen damit den Mechanismus der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (Bay et al., 2013).

Jede einzelne Sarkomerverkürzung der Myozyten beutet auf energetischer Ebene Arbeit und verbraucht ATP. Die zur weiteren Nachproduktion von ATP benötigte NADH-Bildung wird durch die Ca^{2+} -induzierte Aktivierung des mitochondrialen Citratzyklus initiiert. Hierzu wird intrazelluläres Ca^{2+} durch den mitochondrialen Ca^{2+} Uniporter (MCU) aufgenommen.

Als Kraftwerke der Zelle stellen Mitochondrien durch die oxidative Phosphorylierung von ADP in enger topographischer Nähe zur Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran wesentliche Mengen von energiereichen Phosphaten bereit und decken ca. 92 % des ATP-Bedarfs damit kontinuierlich ab (Gunter and Sheu, 2009). Die elektromechanische Kopplung im Herzen verbraucht bereits ca. 2% des gesamten zellulären Pools an ATP pro Herzschlag (Nickel et al., 2013). Im Rahmen der Kontraktion ist ATP hierbei für das Lösen der Myosinköpfe vom Aktinfilament von grundlegender Bedeutung.

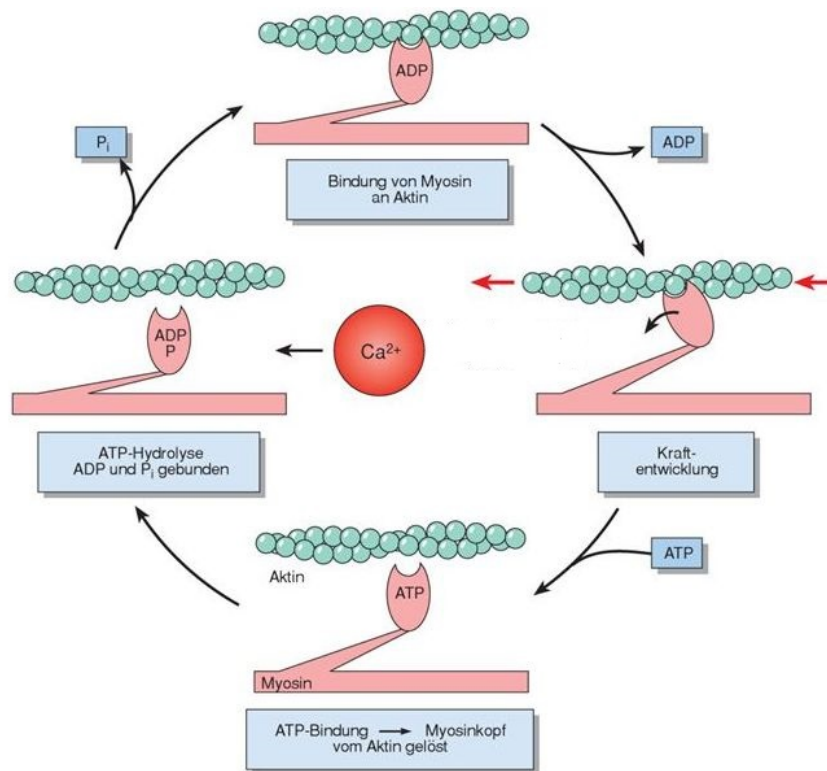


Abbildung 3: Der Querbrückenzyklus der Myofibrille und die Rolle von ATP. Die an Myosin gebundene ATPase spaltet ATP per Hydrolyse in ADP und P_i . Die Aufspaltung führt zu einer Lösung des Myosinkopfes. Sobald die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration ansteigt, kommt es zu einer festen Querbrückenbildung, bei dem sich der Myosinkopf an ein benachbartes Aktin-Molekül anheftet. Aktin löst wiederum die Freisetzung des ADP aus. Dadurch wird die Verspannung letztendlich in mechanische Energie und eine Kraftentwicklung umgewandelt. Solange ATP vorhanden ist, können der Querbrückenzyklus und die nächste Kontraktion somit von neuem beginnen (Modifiziert nach Deetjen, Speckmann, Hescheler; Physiologie, 2005).

Die Atmungskette benötigt für die ATP Synthese kontinuierlich die Bereitstellung von Elektronen durch die Reduktionsäquivalente NADH und $FADH_2$. Diese werden innerhalb der mitochondrialen Matrix als Hauptprodukte aus dem Citratzyklus zur Verfügung gestellt. Die Substrate für den Citratzyklus hingegen stammen vor allem aus dem Fettsäuremetabolismus (70%) und der Glykolyse (30%) (Nickel et al., 2013). NADH und $FADH_2$ geben ihre Elektronen auf das Coenzym Q ab. Dieser Schritt vollzieht sich bei NADH über die NADH-Dehydrogenasen, den Komplex I der Atmungskette; bei $FADH_2$ mit Hilfe der Succinat-Dehydrogenase, den Komplex II der Atmungskette. Vom Coenzym Q werden die Elektronen von der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) auf das Cytochrom c transferiert und in der Folge über mehrere kleine Zwischenschritte auf den Komplex IV transferiert. Dieser

Abschnitt beinhaltet die Reduktion von Sauerstoff unter der gleichzeitigen Synthese von Wasser.

An der Atmungskette entsteht bereits unter physiologischen Bedingungen Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) an den Komplexen I und III. Die maximale Superoxidproduktion entsteht in der Abwesenheit von ADP und der Gegenwart der benötigten Substrate (state 2 oder 4 respiration). Die sequentiellen Folgemechanismen mit Redoxreaktionen über die Komplexe I, III und IV führen zur Translokation von Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Konsekutiv entsteht durch das Protonen-Ungleichgewicht das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und der pH Gradient (ΔpH), welche beide die wesentliche Treibkraft der F_1F_0 -Synthase der Atmungskette darstellen. Diese stellt wiederum den Rücktransport der in den intermembranösen Raum geschleusten Protonen entlang ihres elektromechanischen Gradienten sicher und damit die Generierung von ATP aus ADP und P_i (Murphy and Steenbergen, 2007). In der fortdauernden Bereitstellung von ATP stellen Ca^{2+} und ADP somit wichtige Regulationsfaktoren dar, da sie die oxidative Phosphorylierung maßgeblich beeinflussen. Im Rahmen von gesteigertem ATP-Verbrauch bei vermehrter Arbeitslast stimuliert ADP die F_1F_0 -ATP-Synthase und damit die erneute ATP-Bereitstellung. Folglich kommt es zum beschleunigten Elektronentransport entlang der Atmungskette, der Wiederherstellung des Protonengradienten ΔpH und zur Oxidation der Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 (Maack and O'Rourke, 2007).

Unter einer β -adrenergen Stimulation und der damit verbundenen physiologischen Arbeitslasterhöhung ist es somit unabdingbar einen ausgeglichenen Redoxstatus von NADH/ NAD^+ und FADH_2/FAD und damit ein ausbalanciertes Verhältnis von ADP zu ATP zu generieren. Durch vermehrte Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) kommt es zu höheren Frequenzen und Amplituden von zytosolischen Ca^{2+} -Transienten (Bers, 2002). Das einströmende und sich in der mitochondrialen Matrix anreichernde Ca^{2+} akkumuliert und stimuliert zum einen Schlüssel-Enzyme des Citratzyklus, um die Bildung von NADH aus NAD^+ und FADH_2 aus FAD für die ATP-Synthese zu gewährleisten (Nickel et al., 2013). Zum anderen fördert es auch gleichzeitig die F_1F_0 -ATP Synthase und damit weiterhin die Regenerierung von NADH (Territo et al., 2000). Die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration hängt dabei stark vom intrazellulären Na^+ Gehalt ab. Entsprechend wird das mitochondriale Ca^{2+} über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCLX) wieder nach extramitochondrial

transportiert (Bay et al., 2013). Aufgrund der im Vergleich zum MCU langsameren Kinetik des NCLX benötigt der Ca^{2+} -Abfall in Mitochondrien mehr Zeit als im Zytosol (Maack et al., 2006). Das hierunter akkumulierende mitochondriale Ca^{2+} steht in enger Korrelation zur Wiederherstellung von NADH (Kohlhaas and Maack, 2011).

Unter physiologischen Bedingungen wird unter Arbeitslasterhöhung somit die zur ATP-Produktion getriggerte Oxidation von NADH bzw. NADPH (ADP) durch Ca^{2+} -induzierte Stimulation des Citratzyklus und Regeneration von NADH und FADH_2 adäquat kompensiert. (Abbildung 5). Dieses energetische Gleichgewicht verhindert im gesunden Herzen das Entstehen von oxidativem Stress.

2.2.3 Die Entstehung und Elimination von ROS in Mitochondrien

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen als ein Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung an der Atmungskette bei der unvollständigen Reduktion von O_2 zu $\cdot\text{O}_2^-$ im Rahmen der ATP-Synthese. Ein Großteil bisheriger Arbeiten konnte zeigen, dass Mitochondrien in beinahe allen Zelltypen dabei die wesentliche Hauptquelle bei der Bildung von ROS darstellen (Adam-Vizi, 2005; Balaban et al., 2005; Hool et al., 2005; Ide et al., 1999; Murphy, 2009; Turrens, 2003), wenngleich nicht komplett alle bisherigen Autoren damit konform gehen (Brown and Borutaite, 2012). Als andere wesentliche Quellen wurden vor allem die entkoppelten NO-Synthasen (NOSs) (Dixon et al., 2003) und die mitochondrialen NADPH-Oxidasen (NOX2 und NOX4) beschrieben (Burgoyne et al., 2012; Nickel et al., 2014; Zhang et al., 2013). Überwiegend die Komplexe I und III der Atmungskette nehmen eine zentrale Rolle als Entstehungsorte der hochreaktiven Radikale ein (Brand, 2010; Murphy, 2009). Gleichzeitig werden die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Mitochondrien durch antioxidative Substanzen möglichst rasch eliminiert. Verschiebt sich das sensible Gleichgewicht in Richtung Produktion der ROS und zu Lasten der Elimination, kommt es zur Emission von ROS, welches als oxidativer Stress bezeichnet wird. Oxidativer Stress bedeutet damit letztlich ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion und Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies (Kohlhaas et al., 2017).

Zur heterogenen Gruppe der ROS zählen sowohl $\cdot\text{O}_2^-$, die hochreaktiven Hydroxyl-Radikale ($\cdot\text{OH}^-$), aber auch das nichtradikale Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das durch Übertragung eines Elektrons (e^-) in Hydroxyl-Radikale umgewandelt wird. Im Rahmen der antioxidativen Kapazität wird das an der Atmungskette und durch Oxidation von NADH entstandene $\cdot\text{O}_2^-$, mit Hilfe der Mangansuperoxiddismutase (Mn-SOD) zu H_2O_2 dismutiert. Dieses Zwischenprodukt wird letztendlich durch die Glutathionperoxidase (GPX) und Peroxiredoxin (PRX), die jeweils durch NADPH-abhängiges Glutathion (GSH) und Thioredoxin (TRX) regeneriert werden, zu Wasser abgebaut (Balaban et al., 2005; Chen and Zweier, 2014; Murphy, 2009, 2016; Zorov et al., 2014).

Mitochondrien verfügen über einen Pool an verschiedenen entgiftenden Enzymen, die ihre Redoxäquivalente von NADH beziehen (Kohlhaas et al., 2017). Das Bereitstellen von NADPH mittels Bildung aus NADP^+ ist dabei von diversen Enzymen wie der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase (IDPm), der Malat-Decarboxylase oder der Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (NNT) abhängig, die hierzu wiederum ausnahmslos Substrate des Citratzyklus benötigen. (Kohlhaas et al., 2017)

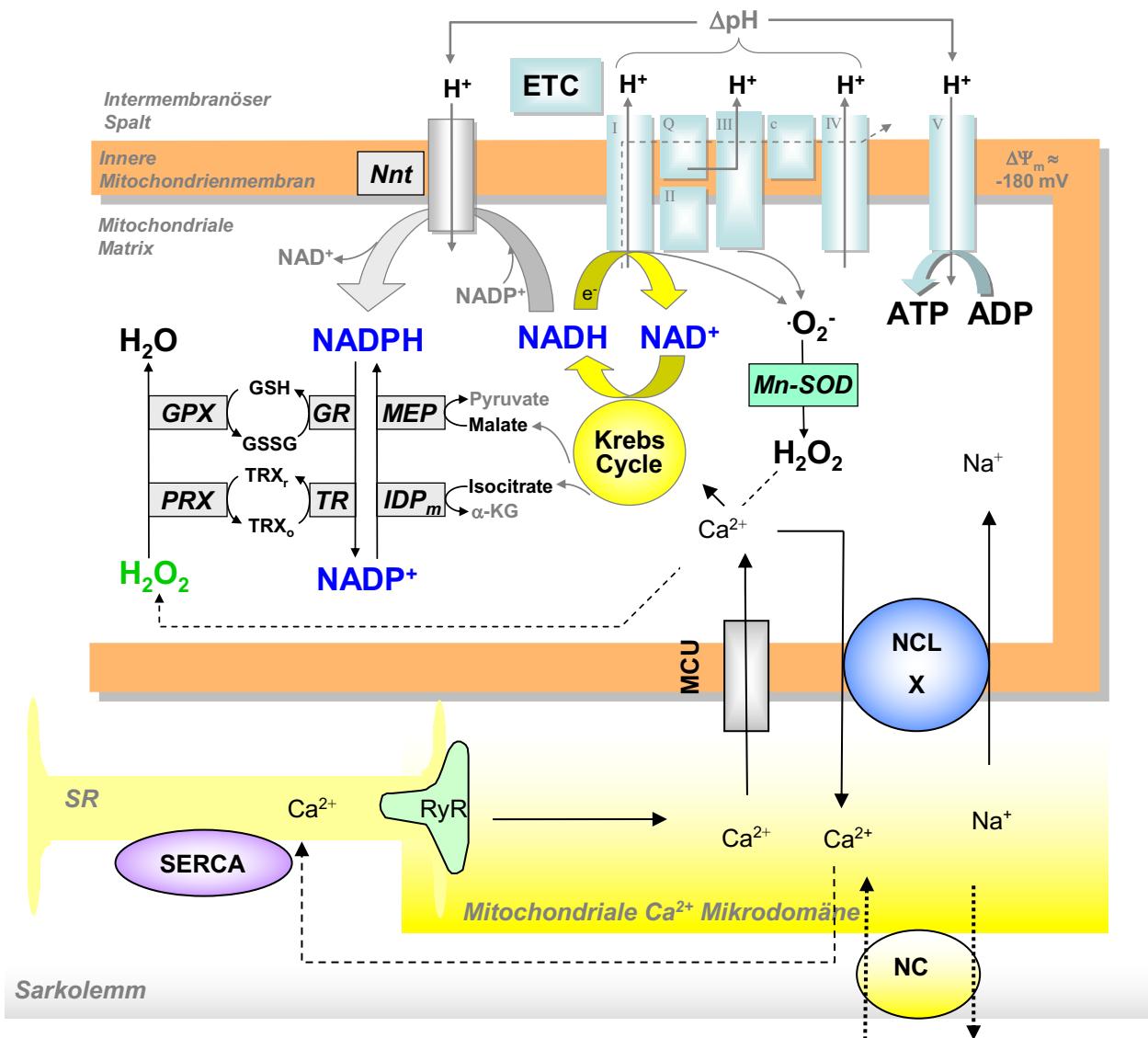


Abbildung 4: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung, der mitochondrialen Energetik und ROS Produktion bzw. Elimination in Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen.

Durch die Regeneration von NAD^+ zum Elektronen abgebenden NADH , die durch den Citratzyklus sicher gestellt wird, kann ATP kontinuierlich an der Atmungskette produziert werden. Darüber hinaus wird die Aufrechterhaltung der mitochondrialen antioxidativen Kapazität durch die Bildung von NADPH mittels Reduktion von NADP^+ durch die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (NNT) gewährleistet. Alle Schlüsselenzyme des Citratzyklus werden durch mitochondriales Ca^{2+} stimuliert, welches vorrangig über den MCU in die mitochondriale Matrix gelangt. $\Delta\Psi\text{m}$, Mitochondriales Membranpotential; Mn-SOD, Mn^{2+} -abhängige Superoxid Dismutase; PRX, Peroxiredoxin; GPX, Glutathion Peroxidase; TRXr/o, reduziertes/oxidiertes Thioredoxin; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; TR, Thioredoxin Reduktase; GR, Glutathion Reduktase; IDPm, mitochondriale NADP^+ -abhängige Isocitrat Dehydrogenase, MEP, Malat-Decarboxylase; α -KG, α -Ketoglutarat; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} Uniporter; NCLX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher; ETC, Elektronen-Transportkette; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; RyR, Ryanodinrezeptoren; SERCA, SR- Ca^{2+} -ATPase; NCX, sarkolemmaler $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (Kohlhaas et al., 2010).

Als wesentliches Merkmal der mitochondrialen NNT besitzt dieses Enzym der inneren Mitochondrienmembran die Fähigkeit, auf die jeweiligen Pools von NADH und NADPH zurückzugreifen und die Reaktion $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+$ in beide Richtungen zu katalysieren. Diese Funktion ist eng mit dem über der inneren Mitochondrienmembran bestehenden Protonengradienten gekoppelt. Unter physiologischen Bedingungen arbeitet die NNT dabei im Vorwärtsmodus in Richtung Regeneration von NADPH (Nickel et al., 2014). Damit wird der NNT eine wesentliche Schlüsselrolle in der antioxidativen Kapazität in Mitochondrien zu Teil (Rydstrom, 2006). Im Falle einer Arbeitslasterrhöhung kann die NNT hingegen ihre Funktion ändern und im Rückwärtsmodus arbeiten, um favorisiert NADH und ATP zu regenerieren – allerdings auf Kosten der antioxidativen Kapazität (Nickel et al., 2015b). In C57BL/6 Mäusen der Jackson Laboratories (BL/6J) besteht eine Mutation des NNT Gens, die zu einem Funktionsverlust der NNT führt (Huang et al., 2006). Eine genetische Deletion der Mangansuperoxiddismutase (Mn-SOD KO) verursacht in BL/6J Mäusen im Vergleich zu anderen Mausstämmen einen schwereren Phänotyp mit Dilatativer Kardiomyopathie (Huang et al., 2006; Kim et al., 2010). Umgekehrt konnte durch den Funktionsverlust der NNT unter Drucküberbelastung in den C57BL/6J Mäusen oxidativer Stress und damit linksventrikuläre Dysfunktion und Zelltod vermieden werden, da unter diesen Bedingungen die NNT Reaktion rückwärts verläuft. Gleiches gilt für die Behandlung der Tiere mit SS-31, einem Tetrapeptid, das die mitochondriale ROS-Bildung begrenzt (Nickel et al., 2015b; Szeto, 2014). Betrachtet man sich die Funktionalität von SS-31, so gingen initiale Arbeiten zunächst davon aus, dass SS-31 ein ROS-Fänger („scavenger“) ist (Zhao et al., 2004), während andere Arbeiten eine selektive Interaktion von SS-31 mit Cardiolipin an der inneren Mitochondrienmembran ohne Radikal-fangende Eigenschaften nachweisen konnten. Diese Interaktion verhindert die Oxidation von Cardiolipin und die Umwandlung von Cytochrom C in eine Peroxidase, wodurch die Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette verhindert wird (Szeto, 2014).

Über die Komponenten ADP und Ca^{2+} stellt der ausbalancierte Redoxstatus somit ein regulatorisches Prinzip für die mitochondriale Energetik dar. Für dessen Aufrechterhaltung scheint die Vermeidung von exzessiver Oxidation als auch maximaler Reduktion an der mitochondrialen Atmungskette unentbehrlich zu sein (Aon et al., 2010; Cortassa et al., 2014; Gauthier et al., 2013; Sequeira et al., 2015a).

Die Abhängigkeit der NADPH Regeneration vom Ca^{2+} -abhängigen Citratzyklus verdeutlicht einmal mehr die Rolle des mitochondrial aufgenommenen Ca^{2+} hinsichtlich der mitochondrialen Energetik. Die mitochondriale Ca^{2+} Aufnahme nimmt Einfluss auf das Gleichgewicht des Redoxstatus und die antioxidative Kapazität und kann damit steigende Emissionen von H_2O_2 unter Arbeitslast erhöhungen verhindern (Kohlhaas et al., 2010; Kohlhaas and Maack, 2010). Inzwischen konnte das Konzept eines Redox-optimierten Gleichgewichts von ROS deklariert werden. Das physiologische Gleichgewicht in Mitochondrien (steady state) und deren ROS Produktion wird dabei durch den variablen Redoxstatus beeinflusst, der sich über NADPH und NADP^+ an energetische Bedingungen anpassen kann (Aon et al., 2010); Abbildung 5). Dadurch kann sowohl die exzessive Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Atmungskette, als auch der Abbau der antioxidativen Kapazität unter schwierigen energetischen Konditionen verhindert werden (Kohlhaas et al., 2017).

2.2.4 Die Auswirkung von vermehrter ROS-Bildung in Kardiomyozyten

ROS verfügen über die Eigenschaft, andere Moleküle zu oxidieren und deren Funktionen maßgeblich zu verändern. Sie schädigen mitochondrial-membranöse Phospholipide sowie zelluläre und mitochondriale DNA und Proteine (Balaban et al., 2005). ROS können zudem posttranslationale Modifikationen maßgeblich beeinflussen und sich gezielt auf Proteine und deren Funktion auswirken (Bayeva and Ardehali, 2010; Terentyev et al., 2008). Darüber hinaus funktionieren sie als Signalmoleküle, die Signalkaskaden zur Entstehung von Hypertrophie auslösen. Durch Öffnung von transpermeablen Poren innerhalb der Zellmembran induzieren sie Apoptose oder nekrotischen Zelltod in kardialen Myozyten (Minuz et al., 2006; Sawyer et al., 2002). Rückblickend konnten in den letzten Jahrzehnten vielfältige molekulare Mechanismen entdeckt werden, die aufzeigen, wie ROS Zellschäden auf verschiedenen molekularen Ebenen induzieren. Unter anderem wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Homöostase von Na^+ und Ca^{2+} in engem ursächlichen Zusammenhang zur ROS Entstehung steht. Na^+ und Ca^{2+} können den Redoxstatus maßgeblich verändern und damit zunächst zu erhöhter ROS Emission führen. Im Sinne eines Circulus vitiosus hemmt ROS folglich die mitochondriale Ca^{2+} Aufnahme (Kohlhaas and Maack, 2010) und führt wiederum dazu, dass das intrazelluläre $[\text{Na}^+]_i$ als auch der mitochondriale Ca^{2+} Ausstrom gesteigert wird

(Liu and O'Rourke, 2008). Sowohl vergrößerte zytosolische Konzentrationen von $[\text{Na}^+]_i$, als auch reduzierte Ca^{2+} Konzentrationen in Mitochondrien führen letztlich zum Anstieg der H_2O_2 Konzentration (Kohlhaas et al., 2010; Kohlhaas and Maack, 2010). Zudem erschwert das erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ den NCX-medierten Ca^{2+} Export, wodurch weniger Ca^{2+} über die Zellmembran aus der Myozyte transportiert wird (Despa and Bers, 2013). Zusammen mit einer bei Herzinsuffizienz reduzierten Expression der SERCA erklären diese Mechanismen die diastolische Akkumulation von $[\text{Ca}^{2+}]_e$ und enden damit in einer vermehrten diastolischen Spannung der Myofilamente (Armoundas et al., 2003; Bers, 2006; O'Rourke et al., 1999). Vor dem Hintergrund, dass wesentliche Schlüsselenzyme des Citratzyklus über Ca^{2+} stimuliert werden, wird klar, dass die Regulierung der Na^+ - und Ca^{2+} -Homöostase einen essentiellen Bestandteil der mitochondrialen Energetik darstellt (Kohlhaas and Maack, 2011).

In Kardiomyozyten wirkt sich oxidativer Stress, ausgelöst durch die erhöhte Emission von ROS, negativ auf die elektromechanische Kopplung aus und lässt darüber hinaus Arrhythmien entstehen. Analog hierzu spielen ROS über diverse pathophysiologische Mechanismen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und dem Voranschreiten der Herzinsuffizienz. Darüber hinaus scheinen Mitochondrien durch eine sogenannte ROS-induzierte ROS-Freisetzung die Bildung von ROS durch Aktivierung anderer Entstehungsquellen, wie beispielsweise den NADPH Oxdasen noch weiter zu verstärken (Kohlhaas et al., 2017). Die Entschlüsselung der Entstehungsprozesse von mitochondrialen ROS könnte demnach in Zukunft zu möglichen pharmakologischen Therapieansätzen bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz führen.

2.2.5 Gleichgewicht von ADP-induzierter Oxidation und Ca^{2+} -abhängiger Reduktion von NADH und NADPH in kardialen Mitochondrien

In den letzten Jahren konnte unter Berücksichtigung vieler experimenteller Arbeiten ein neues Konzept zur Regulation der Entstehung von ROS in Mitochondrien erarbeitet werden. Demnach wird die Bildung von ROS dynamisch durch Ca^{2+} und ADP reguliert (Balaban, 2009; Cortassa et al., 2006; Gauthier et al., 2013; Kohlhaas et al., 2017; Nickel et al., 2013). Dabei stellt ADP zusammen mit Calcium wesentliche Regulatoren des mitochondrialen Redoxstatus der Pyridin Nukleotide NADH/NAD^+ und FADH_2/FAD dar.

Im Rahmen von β -adrenerger Stimulation stimuliert das konsekutiv vermehrt entstehende ADP über einen gesteigerten Elektronenfluss die Aktivität der Atmungskette. In Folge dessen wird auch das aus dem Citratzyklus gespeiste NADH oxidiert bzw. verbraucht (Baudenbacher et al., 2008; Nickel et al., 2013). Gleichzeitig fördert der mitochondriale Calciumeinstrom den Citratzyklus durch Decarboxylierung von Acetyl-CoA und einhergehend die Regeneration von oxidiertem NAD^+ zu NADH. Diese parallele Aktivierung und Gleichschaltung von energieverbrauchenden und gleichzeitig regenerativen Prozessen führt zu einer Verschiebung des NADH/ NAD^+ Redox Status in Richtung Reduktion, unter gleichbleibendem Verhältnis von ATP zu ADP während verschiedener Arbeitslasten.

NADPH, das über die Produkte des Citratzyklus, die nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT), Malat-Decarboxylase (MEP) und die Isozitat Dehydrogenase (IDPm) immer wieder neu gebildet wird, stellt damit zusammen mit NADH das Bindeglied zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Atmungskette dar (Abbildung 4). Ferner regeneriert NADPH die für die antioxidative Kapazität verantwortlichen Enzyme Glutathionreduktase (GR) und die Thioredoxinreduktase (TR), welche zu einer Reduktion der Glutathion Peroxidase (GPX) und von Peroxiredoxin (PRX) führen. Letzten Endes resultieren diese Mechanismen in einer Elimination des H_2O_2 zu Wasser (H_2O). NADPH nimmt eine grundlegende Funktion in der Aufrechterhaltung der antioxidativen Funktion der Mitochondrien (Liu et al., 2014; Nickel et al., 2013), der Bereitstellung der damit verbundenen Enzyme und schlussendlich in der konstanten Elimination von überschüssigem H_2O_2 aus den Mitochondrien ein (Nickel et al., 2014; Witjas-Paalberends et al., 2014b).

Gemäß diesem Verständnis von mitochondrialer Energetik kann eine entstehende Diskrepanz zwischen verminderter mitochondrialer Ca^{2+} -Aufnahme und ansteigender Arbeitslast mit erhöhter Atmungsketten-Aktivität eine Nettooxidation von NADH und konsekutiv auch NADPH verursachen, welche in der Verringerung der antioxidativen Kapazität und damit steigenden Emission von H_2O_2 endet (Kohlhaas et al., 2017).

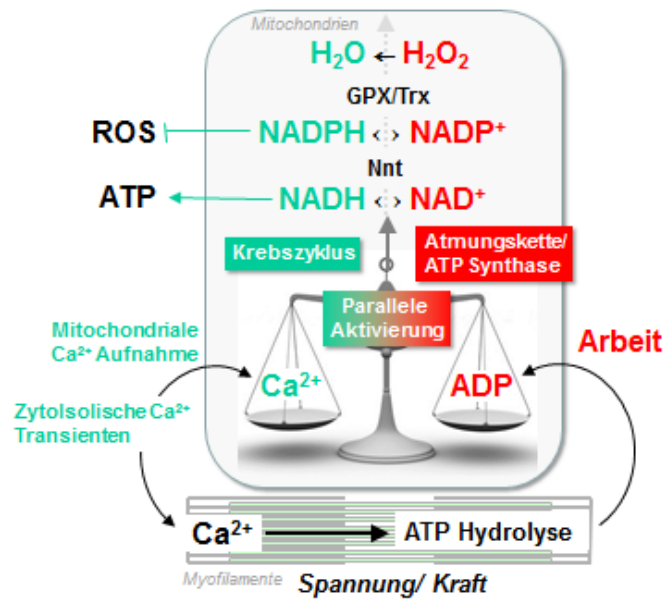


Abbildung 5: Energetisches Gleichgewicht im gesunden Herz. Im gesunden Herzen kann während einer beta-adrenergen Stimulation die ADP-induzierte Oxidation von NADH und NADPH durch Ca²⁺-Stimulation des Citratzyklus adäquat kompensiert werden. Die Redoxäquivalente NADH und FAD sind dabei die zentralen Spielmechanismen für die Aufrechterhaltung des energetischen Gleichgewichts (Kohlhaas et al., 2017).

2.2.6 Vermehrter oxidativer Stress in Kardiomyozyten bei HCM

Bereits frühere Arbeiten konnten zeigen, dass bei HCM Patienten neben erhöhten Markern von Inflammation (Dimitrow et al., 2008) und endothelialer Dysfunktion (Dimitrow et al., 2007) auch die Serummarker für oxidativen Stress, wie beispielsweise 8-isoprostaglandinF2alpha (8-iso-PGF2alpha), einem Produkt der nichtenzymatischen Arachnidonsäure Peroxidation, erhöht waren - vor allem im Falle der obstruktiven Form (HOCM) mit systolischer Dysfunktion. Das Obstruktionsmaß des linksventrikulären Ausflusstrakts korrelierte dabei eng mit der Höhe der 8-iso-PGF2alpha-Spiegel (Dimitrow et al., 2009). Bisher konnte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (Vassalle et al., 2003), akutem Myokardinfarkt (Elesber et al., 2006), Diabetes, inflammatorischen Erkrankungen, Nierenversagen und Herzinsuffizienz vermehrt oxidativer Stress im Serum nachgewiesen werden (Forbes et al., 2008; Seddon et al., 2007). Auch bei anderen experimentellen Herzinsuffizienz-Modellen, die sich durch eine linksventrikuläre Drucküberbelastung auszeichneten, konnte vermehrt oxidativer Stress festgestellt werden (Henderson et al., 2007;

Jacob et al., 2006; Sawyer et al., 2002). Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die sich gezielt mit der Bildung von oxidativem Stress bei HCM auseinandersetzen. 2005 wiesen Nakamura et. al an endomyokardial entnommenen Markerproteinen vermehrten oxidativen Stress bei betroffenen HCM Patienten nach (Nakamura et al., 2005a).

Bisherige Arbeiten beschäftigen sich vorrangig mit dem serologischen Nachweis von Stressmarkern und begründen sich nicht auf invasiv-endomyokardial entnommenen Gewebeproben (Nakamura et al., 2005b). Die grundsätzliche Frage besteht darin, ob die HCM mit dem über Serummarker nachgewiesenen oxidativen Stress assoziiert ist oder ob dieser wesentlich an der pathophysiologischen Entstehung des Krankheitsbildes beteiligt ist.

Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress sind wichtige Komponenten in der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, ihre Rolle bei der HCM ist bisher allerdings noch unverstanden. Nicht-invasive Studien konnten zeigen, dass die mitochondriale Energetik bei HCM Patienten mit milder oder ohne Symptomatik bereits geschädigt ist, was wiederum darauf hinweist, dass mitochondriale Schäden bereits früh eine Rolle in der Entwicklung der HCM spielen könnten (Jung et al., 1998; Unno et al., 2009). Die grundlegend mitochondriale Funktion und damit auch die des Muskuloskeletaltrakts scheint bei HCM betroffen zu sein. Es konnte eine Korrelation der muskuloskeletalen Funktionseinschränkung zur HCM nachgewiesen werden bei gleichzeitig reduzierter maximaler Leistungsfähigkeit der betroffenen Patienten (Frenneaux et al., 1989).

2.2.7 Struktur und Funktion des Myosin bindenden Protein C

Das Myosin-bindende Protein C (MyBPC) konnte bereits vor über 40 Jahren erstmalig als ein Bestandteil des muskulären Myosin identifiziert werden (Starr and Offer, 1971). Seine Rolle innerhalb der Sarkomere ist allerdings nach wie vor nicht vollständig aufgedeckt. Im menschlichen Körper konnten bis dato drei gleichwertige Isoformen des MyBPC ausgemacht werden. Die Isoform der glatten Muskulatur MYBPC1, die der quergestreiften Muskulatur MYBPC2, und die kardiale Isoform cMyBP-C. Das Protein besteht aus acht Immunoglobulin-ähnlichen und drei Fibronectin-ähnlichen Domänen. Im Vergleich zu den ersten beiden

Isoformen besitzt cMyBP-C charakteristische Strukturmerkmale, die eine zusätzliche Regulation verschiedener Signalkaskaden ermöglicht (Carrier et al., 2015).

Bereits in den 1990er Jahren konnte das kardiale MyBP-C dem Genabschnitt des Chromosoms 11p11.2 zugeordnet werden. MyBP-C ist ein Polypeptid, das zur großen Familie der intrazellulären Immunoglobuline gehört. Es setzt sich bausteinförmig aus Sarkomeren A-Banden zusammen und liegt innerhalb dieser in zentraler Position, die auch als Z-Zone beschrieben wird. Der Raum zwischen den Z-Zonen (43 nm) limitiert dabei die Anzahl der Myosinköpfchen, die während der elektromechanischen Kopplung an das Myosin temporär binden (Craig and Offer, 1976; Witt et al., 2001). Im Rahmen der elektromechanischen Kopplung führt die Phosphorylierung des MyBP-C letztlich zur Kontraktion der Muskelfilamente (Watkins et al., 1995). Mit einer Größe von 140.5 kDa besteht MyBP-C aus 1273 Aminosäuren, das hierzu kodierende Gen Mybpc3 beinhaltet darüber hinaus über 21000 Basenpaare und 35 Exons (Carrier et al., 1997).

2.2.8 Bedeutung der Mutation des Myosin bindenden Protein C in der Pathogenese der HCM

Inzwischen konnten mehr als 350 unterschiedliche Mutationen von Mybpc3 bei HCM Patienten identifiziert werden (Carrier et al., 2015). Ca. 50% der Mybpc3 Mutationen entstehen durch spontanes Abschneiden von kodierenden Bereichen, bei anderen Mutationen fehlt die Mybpc3 Region vollständig (Watkins et al., 2011). All diese Mutationen enden in ihrer Konsequenz in einer erhöhten Calcium Affinität der Myofilamente und darüber hinaus in einer pathologisch-erhöhten Kontraktilität und diastolischen Dysfunktion (Ho et al., 2002). Über welche genauen Mechanismen diese beschriebenen Mutationen letztendlich die linkventrikuläre Hypertrophie und zum Teil auch Arrhythmien verursachen, ist bislang nicht geklärt. Denn obwohl die zu Grunde liegenden Mutationen bislang weitestgehend ausgemacht wurden, konnte daraus bisher kein relevanter pharmakologischer Therapieansatz, der die langfristige Prognose der HCM beeinflussen würde, entwickelt werden (Watkins et al., 2011). Aufgrund der durch die verschiedenen bekannten Genmutationen der HCM begründeten, uneinheitlichen Pathogenese erscheint ein vereinheitlichter Therapieansatz für den Großteil der HCM-Formen derzeit schwierig (Halдар and Srivastava, 2016).

Während bereits früh in mehreren tierexperimentellen HCM Modellen eine erhöhte Ca^{2+} Affinität der Myofilamente festgestellt werden konnte, in dessen Zusammenhang es zu Energiemangel, mechanischer Entkopplung und ventrikulären Tachykardien kam (Huke et al., 2013), konnten diese Beobachtungen inzwischen auch bei Patienten mit HCM bestätigt werden. Die dadurch verstärkte Inotropie verlängert nicht nur das Aktionspotential, sondern erhöht auch das Risiko von ventrikulären Ektopien und dauerhaften Tachykardien (Baudenbacher et al., 2008; Schober et al., 2012). Bei MyBP-C-Mutationen konnte eine Hypophosphorylierung der Myofilamente als Ursache der erhöhten Calciumsensitivität der Myofilamente beobachtet werden. Diese konnte durch eine Behandlung mit PKA, die durch Phosphorylierung von Troponin I wesentlich die längen-abhängige Kraftentwicklung beeinflusst, revidiert werden (Sequeira et al., 2013).

Sequeira et al. konnten allgemein zeigen, dass Sarkomer Mutationen, die mit einem kompletten Verlust der kodierenden Genregion assoziiert waren, zur Beeinträchtigung der längen-abhängigen Zunahme der Maximalkraft führen (Sequeira et al., 2013).

Die erhöhte Calciumsensitivität in HCM könnte allerdings ebenso ein möglicher Kompensationsfaktor sein, der die systolische Funktion aufrecht erhalten soll (Huke and Knollmann, 2013). Allerdings scheint die sarkolemmale Kraft-Längen-Beziehung (Frank-Starling-Mechanismus) bei HCM Patienten selbst unter erhaltener linksventrikulärer Funktion durch erhöhte Calciumsensitivität geschädigt zu sein (Huke and Knollmann, 2013).

Der Beeinträchtigung der längen-abhängigen Kraftentwicklung beeinträchtigt die Anpassung der Inotropie an dynamische Veränderungen der ventrikulären Füllung (Vorlast). Die durch die verminderte ventrikuläre Entleerung entstehende steigende Wandspannung könnte ihrerseits neuroendokrine Mechanismen aktivieren - ähnlich wie unter den pathophysiologischen Bedingungen eines Herzinfarkts (Huke and Knollmann, 2013). Eine Behandlung mit Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) und Statinen, die mitunter auch antioxidativ wirksam sind, zeigten bei gleichzeitig hohem Aldosteronspiegeln positive Effekte in einem HCM-Tiermodell (Patel et al., 2001; Tsybouleva et al., 2004). Eine entsprechend frühe Behandlung in HCM-Mausmodellen konnte die Entstehung des Phänotyps merklich verhindern. Eine präventive Behandlung mit einem

Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Antagonisten konnte ebenso im HCM-Mausmodel die Ausbildung einer kardialen Fibrose verhindern (Teekakirikul et al., 2010). Gleichzeitig zeigte die klinische INHERIT-Studie zuletzt keinen Effekt von Hemmern des RAAS bei symptomatischen HCM Patienten (Olivotto and Ashley, 2015).

Vor diesem Hintergrund scheint die Hochregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems somit gerade in der Anfangsphase der HCM-Entstehung eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Sarkomer Mutationen bis zur Phänotypentstehung zu spielen. Erhöhte Level von Angiotensin-converting enzyme (ACE) and Angiotensin II (Ang II) in Patienten mit HCM und die entsprechende Assoziation mit HCM-auslösenden Genmutationen unterstreichen diese These (Kozhevnikova et al., 2014; Rani et al., 2017).

In Zusammenschau der Arbeiten der letzten Jahre konnten zwei wesentliche Mechanismen zur Kenntnis gebracht werden, die erklären, wie sarkomerische Mutationen die Ca^{2+} Homöostase der Myofilamente tangiert. Zum einen wirken sich die Mutationen auf die regulatorischen Proteine Tropomyosin, Troponin T und Troponin I aus, die die dünnen Muskelfilamente beeinflussen und daraufhin die Calcium Affinität des Troponin C erhöhen (Robinson et al., 2007). Gleichzeitig führen die Mutationen von Myosin und MyBP-C zur Ausbildung von zusätzlichen Querbrücken zwischen dünnen und dicken Myofilamenten. Troponin ist dabei als der wesentliche dynamische Puffermechanismus für Ca^{2+} im Sarkoplasma beschrieben (Smith et al., 2000). Eine vermehrte Ca^{2+} Sensitivität bewirkt entsprechend auch einen zytosolischen Anstieg von Ca^{2+} in der Diastole. Als zweite Folge steigern Sarkomer-Mutationen die energetischen Anforderungen der Myosin-ATPase, nun ATP zu ADP und P_i zu hydrolysieren. Die wesentlichen ATP-verbrauchenden Prozesse wie der Querbrückenzyklus sind in ihrem Ablauf allerdings gehemmt und gleichen dieses Energiedefizit möglicherweise zunächst aus. Es wird allerdings vermutet, dass durch den geschädigten Energiehaushalt andere myofilamentäre ATP-konsumierende Bestandteile negativ beeinflusst werden, wie beispielsweise die Expression der SR Ca^{2+} ATPase (SERCA), wodurch der diastolische Ca^{2+} Ausstrom reduziert werden würde (Watkins et al., 2011). Passend hierzu konnte durch Messungen an Myofibrillen von HCM-Kardiomyozyten, die ihrerseits durch assoziierten Mutationen der MYH7 und der TNNT2 entstanden, neben den bekannten Mechanismen auch ein vermehrter spannungsabhängiger ATP-Verbrauch festgestellt werden. Daraus entwickelt sich eine gesteigerte Arbeitslast und ein Energiedefizit

für jede einzelne Kontraktion und Relaxation der Myozyte (Baudenbacher et al., 2008; Belus et al., 2008; Schober et al., 2012). Der vermehrte spannungsabhängige ATP-Verbrauch geht mit einer erhöhten Störanfälligkeit für Arrhythmien zu Kosten einer regelrechten Weiterleitung der Aktionspotentiale (Witjas-Paalberends et al., 2014a). Die Tatsache, dass die zugrundeliegenden Mutationen zwar in der Summe zu zellulären und myofilamentären Störungen führen, gleichzeitig aber Patienten mit HCM für lange Zeit bis zum Tod asymptomatisch bleiben können, legt nahe, dass auch kompensatorische Gegenmechanismen existieren (Watkins et al., 2011)

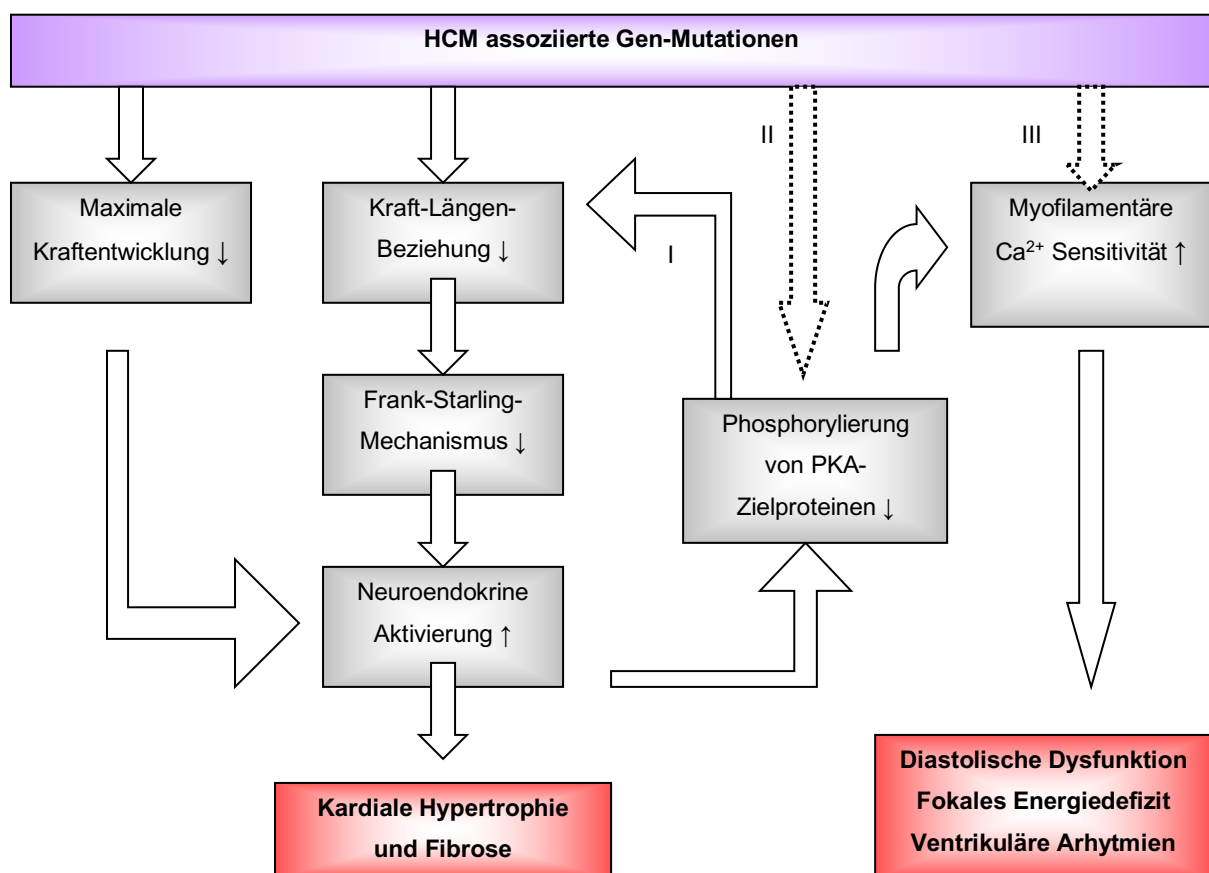


Abbildung 6: Rolle der HCM assoziierten Genmutationen und strukturelle Pathophysiologie der HCM.

I: Hypophosphorylierung von PKA kann die Kraft-Längen-Beziehung negativ beeinflussen. II: HCM Mutationen können sich auch direkt auf die myofilamentäre PKA-Phosphorylierung auswirken. III: Ein Teil der HCM Mutationen führt direkt zur erhöhten Calciumsensitivität der Myofilamente (Modifiziert nach Huke and Knollmann, 2013 und Sequeira et al., 2013).

In Bezugnahme auf die differente HCM-Pathophysiologie versuchten Davis und Haldar et al. den mechanisch-errechneten Parameter „tension index“ zu etablieren, der die Verbindung zwischen den verschiedenen beschriebenen Mutationen der Sarkomerproteine und dem klinischen Bild der Kardiomyopathien näher beleuchten sollte (Davis et al., 2016). Der Umfang und die Dauer der myofilamentären Anspannung korreliert dabei mit dem Ausmaß kardialen Wachstums *per se* und der hereditären Kardiomyopathieförmen (HCM und DCM), wenngleich sich dadurch keine quantitative Aussage zu den kardialen Umbauprozessen und dem Rückschluss auf spezifische Sarkomermutationen treffen lässt (Dorn, 2016). Bei den konzentrischen und hyperkontraktilen Herzen der HCM-Mäuse verschob sich das durch Kraft gegen Zeit aufgetragene Spannungsintegral in Richtung stärkerer Anspannung und Kraftentwicklung. Bei den exzentrisch umgebauten DCM Herzen ergab sich hingegen ein negativer Index (Haldar and Srivastava, 2016). Das Kraft-Zeit-Integral stellt damit einen Vorhersageparameter für Art und Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie dar. Bei den HCM Tieren konnten im Gegensatz zu den DCM Herzen gesteigerte Protein-Spiegel von MAP (mitogen-activated protein) Kinasen ERK1/2 festgestellt werden (Davis et al., 2016). In einem anderen HCM-Modell waren diese Konzentrationen unter Einwirkung von ROS ebenfalls erhöht (Wilder et al., 2015). Demnach lässt sich schlussfolgern, dass möglicherweise eine erhöhte ROS Emission in Kardiomyozyten auch die Hypertrophieform (konzentrisch oder exzentrisch) maßgeblich beeinflusst. Mögliche Therapieansätze für vererbte Kardiomyopathien könnten hierdurch konstituiert werden (Davis et al., 2016).

2.3 Fragestellung der Arbeit

Bisher waren die zugrundeliegenden genauen Pathomechanismen hinsichtlich der Entstehung des oxidativen Stresses in Myozyten im Rahmen des HCM kaum verstanden. Ziel unserer Arbeit war es zu untersuchen, welche Auswirkungen HCM-auslösende Mutationen und die dadurch entstehende vermehrte Calcium-Affinität der Myofilamente (Frey et al., 2012; Watkins et al., 2011) auf den mitochondrialen Energiehaushalt und den Redoxstatus von Kardiomyozyten hat. Hierzu führten wir gezielt Arbeiten an sowohl isolierten Kardiomyozyten als auch isolierten Mitochondrien von Mäusen mit einer HCM-typischen Mutation von Mybpc3 und Wildtypen durch. Die isolierten Myozyten wurden hierbei einer β -

adrenergen Stimulation und Frequenzerhöhung als physiologischer Arbeitslasterhöhung ausgesetzt und dessen Auswirkung auf elektromechanische Kopplung, den Redoxstatus und die mitochondriale Energetik und ROS-Emission untersucht. An isolierten Mitochondrien wurden Atmungsaktivität, H_2O_2 Emission und Superoxid Produktion in der Abwesenheit und Gegenwart von ADP bestimmt.

3. Material und Methoden

3.1 Messung an isolierten Myozyten

3.1.1 Versuchstiere

Für unsere Experimente wurden uns freundlicherweise die Versuchstiere von Professor Lucie Carrier, Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt. Um festzustellen, welchen Einfluss die Mutationen in Sarkomer-Proteinen auf den mitochondrialen Redoxstatus und damit auf die antioxidativen Kapazität der Mitochondrien besitzt, verwendeten wir ein Myosin-bindendes Protein C (Mybpc3) Knock-In Maus-Modell. Dieses Modell besitzt eine humane HCM-typische Punktmutation im Mybpc3 Gen (c.772G>A). Diese Mäuse werden im Folgenden als Mybpc3 KI bezeichnet. Als Resultat entwickeln die Mybpc3 KI durch diese Mutation eine erhöhte Calcium-Sensitivität der Myofilamente und darüber hinaus eine diastolische Dysfunktion (Guidelines for HCM, 2014; Carrier et al., 2015; Watkins et al., 2011).

Das Erbgut der Mybpc3 Mäuse wird nach den Mendelschen Gesetzen vererbt, sie überleben bis zum Erwachsenenalter und sind fruchtbar. Bei homozygoten Mutationen entsteht der kranke Phänotyp, während sich unter heterozygoten Varianten ein milder Phänotyp bildet. Durch die erhöhte Calciumsensitivität der Myofilamente beginnen die betroffenen Tiere bereits drei Wochen postnatal eine kardiale Hypertrophie mit vergrößerten Verhältnissen von Herzgewicht zum Körpergewicht zu entwickeln, einhergehend mit ausgedehnten (dilatierten) Ventrikeln und verschlechterter diastolischer und pathologisch verstärkter systolischer Pumpfunktion. Nach zehn bis elf Monaten entwickeln die Herzen eine linksventrikuläre und eine – für die HCM spezifische – asymmetrische Hypertrophie des Septums (Carrier et al., 2004).

In weiterer Betrachtung präsentieren die Mybpc3 Mäuse ein histologisch sehr ähnliches Bild zu dem von Herzen untersuchter HCM Patienten mit morphologischer Unordnung und interstitieller Fibrose. Die Anzahl, Form und Struktur der Kardiomyozyten bleibt dabei unverändert, während durch ultrastrukturelle Messmethoden bereits derangierte Z-Linien und

zum Teil verkleinerte Mitochondrien in den Kardiomyozyten festzustellen sind (Brickson et al., 2007; Carrier et al., 2004; Luther et al., 2008).

Mutationen des Myosin-bindenden Protein C betreffen somit nicht unmittelbar die Embryogenese und die Entstehung bzw. grundlegenden Aufbau der Sarkomere. Viel mehr besitzen sie in Anbetracht des vorliegenden Mausmodells eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung sarkomerer Signalkaskaden und der kardialen Pumpfunktion.

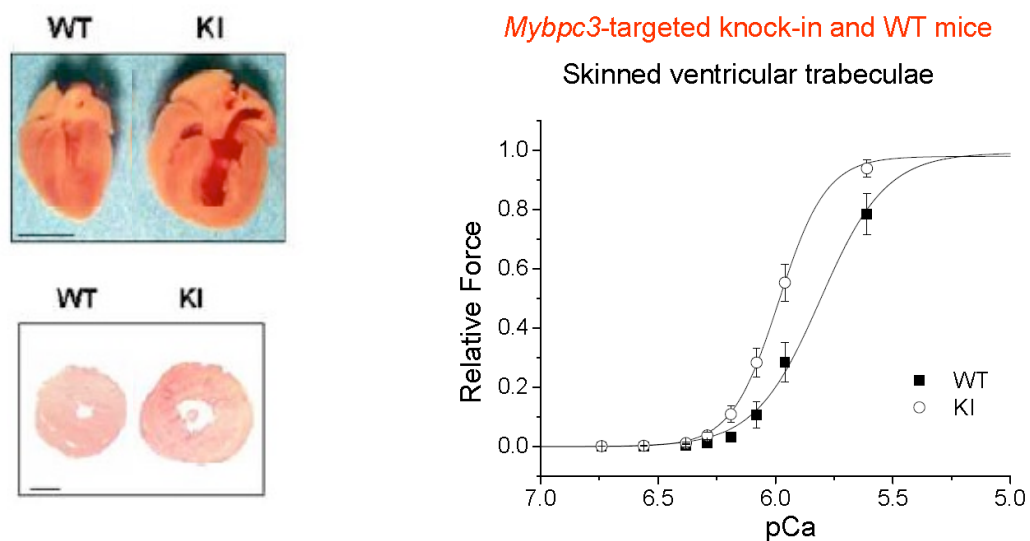


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung von makroskopisch und histologisch vergrößerten Myokard und erhöhter Calciumsensitivität der Mybpc3 Mäuse (Frayse et al., 2012; Vignier et al., 2009).

Die Versuchsgruppe unserer Experimente setzte sich aus einem jeweiligem Wildtyp und dem Mybpc3 KI Typ zusammen. Viele Arbeiten konnten bereits in HCM-Mausmodellen unter inotroper Stimulation einen geschädigten myokardialen Energiehaushalt nachweisen (Javadpour et al., 2003; Spindler et al., 1998). Es ist zudem bekannt, dass HCM Patienten unter erhöhter kardialer Arbeitslast eine nachweislich reduzierte kardiale Reserve besitzen (Critoph et al., 2014). In präliminären Experimenten beobachteten wir, dass Kardiomyozyten während eines 3-minütigen Stimulationsprotokolls mit 30 nM Isoprenalin häufig nicht überlebten. Daher etablierten wir fortan unsere weiteren Versuche im Protokoll eine standardisierte Konzentration des Isoprenalins von 10 nM.

3.1.2 Verwendete Substanzen

Zur in vitro Isolation der Myozyten benutzten wir folgende Substanzen:

Substanzen	mg/L	Firma
Perfusionspuffer		
2,3-Butandion-Monoxim, BDM	101	
Chlorwasserstoff, HCL	36	
D-(+)-Glukose, $C_6H_{12}O_6$	180	
Hepes Natriumsalz, $C_8H_{17}N_2NaO_4S$	238	Sigma-Aldrich Chemie
Kaliumchlorid, KCl	75	GmbH, Steinheim
Kaliumhydrogencarbonat, $KHCO_3$	100	
Calciumchlorid, $CaCl_2$	110	
Magnesiumsulfatheptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246	
Natriumhydroxid, NaOH	40	
Phenolrot	1,2	
Taurin, $NH_2CH_2CH_2SO_3H$	125	
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	126	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, $Na_2H_2PO_4$	120	
Natriumchlorid, NaCl	58	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$	84	VWR, Leuven

Stopppuffer 1, 2 und Liberasepuffer

FCS (Bovines Serum)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Liberase Blendzyme 1	Roche Diagnostics, USA

Weitere Substanzen

FCS

Hepes-Pufferlösung

Medium 199, GlutaMAX

Invitrogen, Karlsruhe

Penicillin G (10.000 Units)

Streptomycinsulfat

Zur weiteren Herstellung der genannten Lösungen wurden folgende Gerätschaften benötigt:

Gerät	Hersteller
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Galaxy 16DH	
Vortex Mixer, SN 41119030	Labnet International, NJ, USA

Im weiteren Verlauf wurden folgende Substanzen in vivo an den Tieren angewendet:

Substanz	Hersteller
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
DL-Isiprenalinhydrochlorid (zur Befüllung der osmotischen Pumpe)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa, 5000 I. E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim

Rimadyl Injektionslösung, 1ml enthält 50 mg Carprofen und 10 mg Benzylalkohol	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Softasept N Hautdesinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Wärmematte	Sanitas, Uttenweiler

Das von uns präparierte und genutzte Narkosesystem setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen, (Firma Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten).

Vaporizer Key Fill Isoflurane	
Fluovac Gas Evacuation System	Hugo Sachs Elektronik - Harvard
Oxygen Flowmeter (Fluss 0,5ml/min mit 5% Isofluran)	Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Keyfill Adapter	
Tube Adapter to Fluosorber	

Das benutzte Instrumentarium für Medikamentenapplikation der Versuchstiere und deren Operation inklusive der Myozytenisolation setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Substanz	Hersteller
Aortic Cannula, Durchmesser 1mm	Hugo Sachs Elektronik – Harvard
Langendorff-Perfusionsanlage	Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Feinschere 14088-10	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Pinzette FD281R zum Kanülieren	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pinzette 11272-30 zur Thorakotomie	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Reglo Digital mikroprozessorgesteuerte Dosierpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt
Seidenfaden (6.0)	Suprama, Berlin
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5-0	Johnson-Johnson, Neuss
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MoliNea plus L, Unterlagen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Nadel BSS Microlance 3	Becton Dickinson, N. J., USA
Spritze 1ml BD Plastipak	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sauerstoff	Praxair, Düsseldorf
Binokular, SMZ645	Nikon, Düsseldorf
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fischer Scientific Karlsruhe
Polypropylene Conial Tube	Becton Dickinson, N.J., USA

Die zur Messung der Fluoreszenzen benötigte Gesamtanlage baute sich aus folgenden Einzelteilen zusammen:

Gerät	Firma
Hardware	
Acquisition Computer (inkl. Monitor)	Firma Dell, Frankfurt am Main
CFA Option D: Dual Emission option for CFA300	
CFA300 Cell framing adapter	
FSI700 Fluorescence system interface	
Model TC-324B Heater Controller, Single Channel	Firma Ion Optix, Irland
MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable field rate CCD	
MUS200 μ Step stand alone filter wheel and controller	
Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3)	
Stimulus Isolation Unit (SIU-102)	

Mikroskop Nikon Ti-S/L100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Lampe Xenon short arc lamp -75XE (75W)	Ushio Inc. Tokyo

Anlage

Discofix C Dreiwegehahn	
Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät	B. Braun Melsungen AG,
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	Melsungen
Original Perfusor Spritze 50ml	
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua. dest.)	
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision, Essen

Fixierung und Darstellung der Myozyten

Deckgläschen	VWR International, Darmstadt
Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, N.J., USA
Laminin aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)	Roche
Maus Sarcoma	Diagnostics, Indianapolis

Software

SARCACQ SarcLen Messeinheit für Sarkomerlänge	Firma Ion Optix, Irland
IONWZ IonWizard Core + Analysis	

Die aufgeführten Filter wurden allesamt von der Firma Chroma Technology GmbH, Fürstenfeldbruck bezogen.

Spiegel (Bezeichnung)	Spiegel (nm)	Transmission (nm)	Farbstoffe	Ort
T660LPXR		>660	Durchlicht	Mikroskop
365/535 pc (C120299)	340/540	405/485/>600	Indo / TMRM ⁺	Mikroskop (Filter 1)
89017bs F/TR (120298)	340/490	435/>505	NADH/ FAD/ DCF	Mikroskop (Filter 2)
400DCLP	<400	>400	SBFI/ MitoSOX	Mikroskop (Filter 3)
51001BS	+ <400	/ 400-ca.490 &	MCB/ TMRM ⁺	Mikroskop (Filter 4)
400DCLP	um 490	>510		
650DCXR	<650	>650	Durchlicht	Vor der Kamera
490DCLP	<490	>490	NADH/FAD	PMT Spiegel
Reiner Spiegel	Alle		NADH/FAD	PMT Spiegel
440DCLP	<440	>440	Indo-1/TMRM ⁺	PMT Spiegel
515DCXR	<515	>515	Indo-1/TMRM ⁺	PMT Spiegel
D435/35x	---	435±17,5	NADH	Vorm PMT
D525/30x	---	525±15	FAD	Vorm PMT
D510/40M	---	510±10	SBFI	Vorm PMT
D405/30x	---	405±15	Indo-1	Vorm PMT
D485/30x	---	485±15	Indo-1	Vorm PMT
D605/55x	---	605±27,5	TMRM	Vorm PMT
D340/12x	---	340±6	NADH / Indo	Filterrad
S490/20x	---	490±10	FAD	Filterrad
D540/25x	---	540±12,5	TMRM ⁺	Filterrad
D360±15	---	360±15	SBFI	Filterrad
D380±15	---	380±15	SBFI/MitoSOX	Filterrad

Tabelle 2: Übersicht der angewandten Filter, inklusive der jeweiligen Transmission, verwendeten Farbstoffe und angeordnetem Platz im Versuchsaufbau. DCLP = dichroic long pass.

Die zur Isolation, Inkubation und Messung genutzte Tyrodelösung, deren pH-Wert mit Hilfe von 1M NaOH bzw. 1M HCl auf 7,4 eingestellt wurde, bestand aus den folgend aufgelisteten Substanzen:

Substanz	MG	Hersteller		
L-(+)-Ascorbinsäure	176			
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether) N, N, N',N'-tetraessigsäure. Tetranatriumsalz (EGTA)	468			
D-(+)-Glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180			
Hepes, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238	Sigma-Aldrich	Chemie	
Kaliumchlorid, KCl	75	GmbH, Steinheim		
Kaliumgluconat, KC ₆ O ₇ H ₁₁	234			
Calciumchlorid, CaCl ₂	110			
Natriumgluconat, NaC ₆ O ₇ H ₁₁	218			
Natrium-Hepes, C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa	260			
Natriumpyruvat, C ₃ H ₃ NaO ₃	110			
<hr/>				
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	95	Merck, Darmstadt		
<hr/>				
Natriumchlorid, NaCl	58	Carl Roth GmbH, Karlsruhe		

Zur Inkubation und Myozytenfärbung verwendeten wir die im Folgenden aufgeführten Substanzen:

Substanz	MG	Hersteller
Dimethylsulfoxid, DMSO, C ₂ H ₆ OS	78	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SBFI (AM)	1129	Teflabs, Texas, USA
Indo-1, AM	1010	
MitoSOX	760	Invitrogen, Karlsruhe
Pluronic F-127, P3000MP	/	
TMRM ⁺	501	
Wärmeschrank Heraeus		Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe

Folgende sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden intermittierend in verschiedenen Schritten der Experimente genutzt:

Produkt	Hersteller
Falcon, Blue Max, 15 ml und 50 ml Polypropylene Conial Tube	Becton Dickinson, N.J., USA
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl SafeSeal Reagiergefäße, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen Ø 100 x 20mm Zellkulturschalen Ø 60 x 15mm	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Fluoreszenzen der Myozyten im Mikroskop benötigten wir zudem die folgenden weiteren Produkte:

Substanz	Hersteller
Antimycin A	
FCCP, Carbonyl Cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon	
Gramicidin (A,B,C und D)	Sigma-Aldrich, Chemie
Isoprenalin	GmbH, Steinheim
Monensin	
Natriumzyanid, NaCN	
Strophanthidin	

3.1.3 Myozytenisolation

Auf der Grundlage des AfCS-Protokolls (Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1, 11/05/02) führten wir angepasst an unsere Messanordnungen die Myozytenisolation fortan durch. Hierfür generierten wir im ersten Schritt einen stabilisierenden Perfusionspuffer als Grundlage der Stopp- und Liberasepuffer von insgesamt 250 ml pro Messtag.

Substanz	Konzentration
Perfusionspuffer	
NaCl	113 mmol/L
KCl	4,7 mmol/L
KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/L
Na ₂ H ₂ PO ₄	0,6 mmol/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2 mmol/L
Phenolrot	0,032 mmol/L
NaHCO ₃	12 mmol/
KHCO ₃	10 mmol/L
Hepes Pufferlösung	10 mmol/L
Taurin	30 mmol/L
Glukose	5,5 mmol/L
BDM 10 mmol/L	10 mmol/L

Aufgefüllt auf 250 ml mit Aqua dest. (einfach destilliert)

Unter Verwendung von 1M NaOH bzw. 1M HCL wurde der pH-Wert des Perfusionspuffers auf 7,46 bei Raumtemperatur eingestellt. Daraufhin wurden die Stoppuffer 1, 2 und der Liberasepuffer generiert.

Stoppuffer 1

Perfusionspuffer	9 ml
FCS-Lösung	1 ml
CaCl ₂ 10 mM	12,5 µl

Stoppuffer 2

Perfusionspuffer	28,5 ml
FCS-Lösung	1,5 ml
CaCl ₂ 10 mM	37,5 µl

Liberasepuffer

Perfusionspuffer	20 ml
Trypsin	40 µl
CaCl ₂ 10 mM	25,2 µl
Liberase 0,08mg/ml	2 mg

Vor der Benutzung wurde die Langendorff Perfusionsanlage sowie deren Schlauchsystem mit insgesamt 250 ml Aqua dest. vorgespült. Daraufhin wurde der Perfusionspuffer und die Liberaselösung eingespült. Dabei wurde makroskopisch sichergestellt, dass die später genutzten Schläuche mit Perfusionspuffer, als auch der andere mit Liberasepuffer befüllte Schenkel zum Ende der Vorbereitung komplett luftblasenfrei befüllt waren.

10 Minuten vor der Entnahme der Maus-Herzen zur Isolation der Kardiomyozyten, wurde die Narkose der Versuchstiere durch Gabe eines Blutverdünners 0,5 ml Heparin (1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt), sowie eines Analgetikums 0,1 ml Rimadyl (1:15 mit NaCl 0,9% verdünnt) intraperitoneal eingeleitet. Vor der eigentlichen Entnahme des Herzens wurde das

Versuchstier über ein entsprechendes Narkosegas-System (1,5-2 Vol% Isofluran und 0,5 l O₂/min) beatmet. Bauch und Thorax wurden per Hautdesinfektionsmittel ausgiebig besprüht und nach vorgeschriebener Einwirkzeit desinfiziert. Als letzter präoperativer Schritt wurde eine tiefe Narkose durch Testung auf die Auslösbarkeit des Zwischenzehenreflex klinisch nochmals sichergestellt. Mit Hilfe einer Schere wurde ein V-förmiger Schnitt vom Bauchnabel ausgehend in Richtung Axilla durchgeführt; anschließend wurde das Sternum per Pinzette fixiert und das Zwerchfell in anatomischer Nähe zu den jeweiligen Brustwirbeln durchtrennt. Um das Herz freilegen zu können, wurden zum einem die Brustwirbel beidseits medial durchtrennt, zum anderen das Sternum nach kranial verschoben. Knapp unterhalb des Aortenbogens, der Pulmonal- und der zentralvenösen Gefäße wurde das Herz abgesetzt, entnommen und in ein zuvor mit 10 ml raumtemperierten Perfusionspuffer vorbereitetes 60 mm Schälchen gegeben. Das Organ wurde unter der kontrollierten Sicht eines Auflichtmikroskops kanüliert ohne dabei die Aortenklappe zu verletzen oder die Koronargefäße zu okkludieren. Gleichzeitig wurde das Herz mit Hilfe eines 5-0 Polyesterfadens an der Kanüle der Perfusionsanlage fixiert und störendes Gewebe wie Thymus und Lunge vollständig abgesetzt.

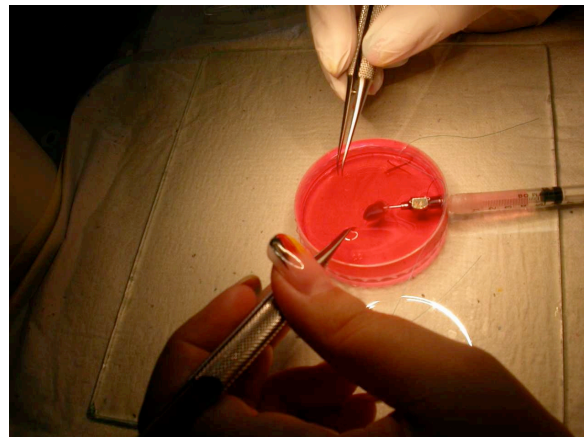


Abbildung 8: Darstellung der operativen Entnahme und der nachfolgenden Kanülierung der Herzen von analgosedierten Mäusen.

Das kanülierte Herz wurde an die Langendorff Perfusionsanlage angeschlossen und mit dem Perfusionspuffer 4 Minuten (2ml/min) gespült. Daraufhin wurde das Organ mit Hilfe des Liberasepuffers für - je nach Organgröße – im Schnitt zirka 8 Minuten verdaut bis es schlaff und leicht fahl aussah. Diese beiden Schritte fanden durchgehend bei einer Temperatur von 37 °C statt.

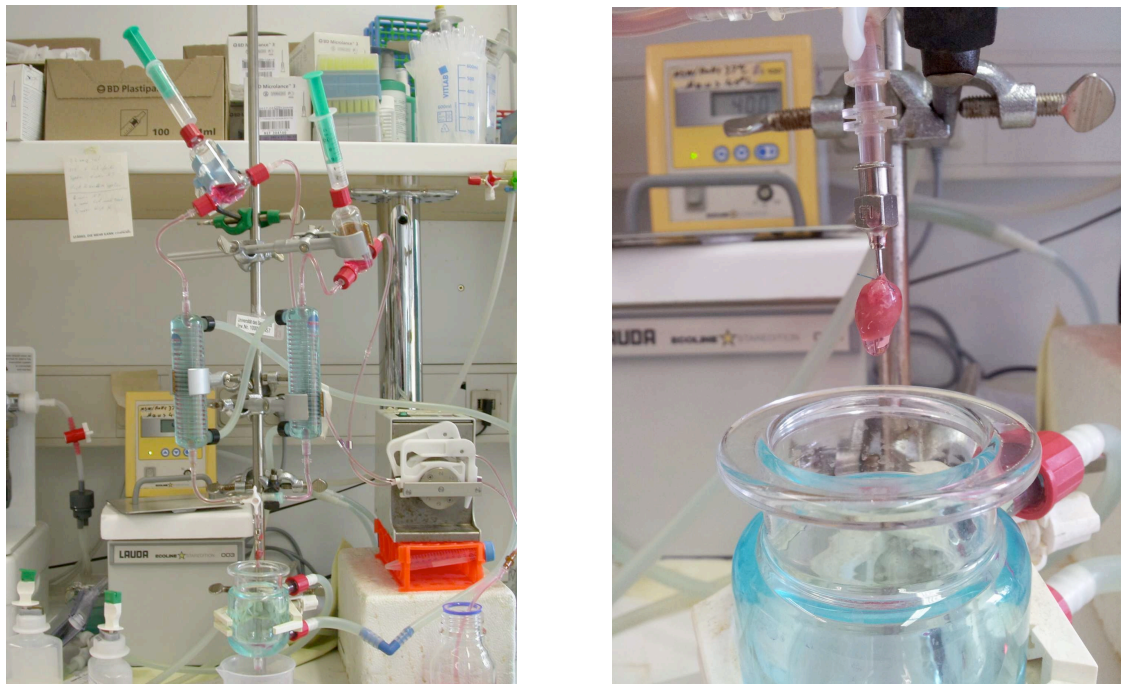


Abbildung 9: Gesamte Darstellung der Langendorff Perfusionsanlage und daran angeschlossenes Herz.

Danach wurden die Arbeitsschritte fortan unter Raumtemperatur durchgeführt. Unter Zurücklassen der beiden Vorhöfe wurde das Herz per Schere von der Kanüle getrennt und in ein mit 5 ml Perfusionspuffer befülltes 60 mm Schälchen übersetzt. Innerhalb dieser Lösung wurde es unter Zuhilfenahme einer Schere viermal möglichst gleichmäßig eingeschnitten und anschließend weiter in ein neues 60 mm Schälchen mit diesmal 5 ml Perfusionspuffer und zusätzlich 5 ml Stopppuffer 1 transferiert. Hier wurde das aufgefächerte Organ 5 Minuten in der Lösung geschwenkt; anschließend kontrollierten wir das vorzeitige Ergebnis der Isolation mit Hilfe eines Tropfens entnommener Myozytenlösung unter einem Durchlichtmikroskop, um eine prinzipielle Aussage über die Qualität der Isolation und der Myozytenmenge stellen zu können.

Hierunter ergab sich im Allgemeinen bei der Sicht durch das Durchlichtmikroskop folgendes Bild der einzelnen Myozyte.

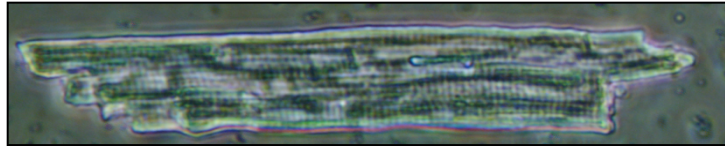


Abbildung 10: Einzeln dargestellte Myozyte unter 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Insgesamt längliche Gesamtform und sichtbare Querstreifung der Myofilamente.

Indikatoren für eine gute Qualität waren dabei, wie hier exemplarisch dargestellt, eine längliche Gesamtform der Myozyte mit sichtbarer Querstreifung im Innern. Im Falle eines positiven lichtmikroskopischen Befundes, wurden die sich bis dorthin gelösten Myozyten in einem 15 ml Falcon Reaktionsgefäß für 5 – 10 Minuten sedimentieren gelassen. Von dem gebildeten Pellet wurde der Überstand abgenommen und dieser für eine weitere Minute bei 800 U/ min zentrifugiert, wodurch sich ein zweites Pellet bildete. Beide Pellets erhielten zur Resuspension jeweils 5 ml Stopppuffer und wurden in einem 100 mm Schälchen zusammengeführt.

Der darauffolgende Calciumaufbau der Myozyten setzte sich aus aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten im Abstand von vier Minuten zusammen. Nach jeder Hinzugabe der Calciumchloridlösung wurde die Resuspension vorsichtig geschwenkt.

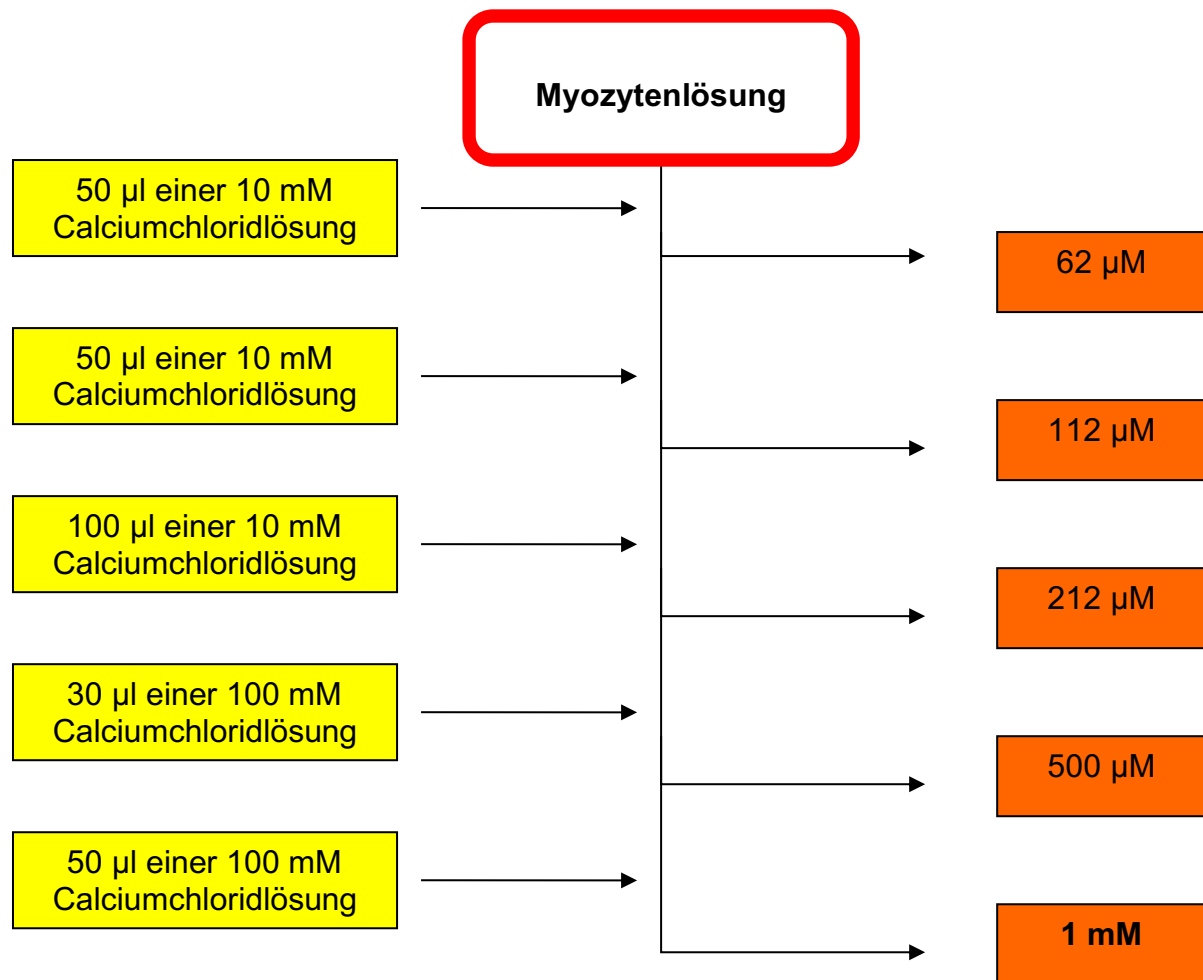


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Calciumaufbaus im Rahmen der Myozytenisolation mit jeweils hinzugegebener Calciumchloridlösung (gelb) und zwischenzeitlicher Ca²⁺ Konzentration (orange).

Unter schrittweiser Hinzugabe von insgesamt fünf steigenden Calciumkonzentrationen wurde am Ende eine 1 mM Calcium enthaltende Myozytenlösung generiert. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Schritten betrug konstant 4 Minuten.

Anschließend ließen wir die resultierende 1mM Lösung in einem 15 ml Falcon Reaktionsgefäß für 8 Minuten sedimentieren. Der anschließend entnommene Überstand wurde bei 800 U/ min zentrifugiert und beide Pellets wieder zusammengeführt. Zu dieser gewonnenen Zellschlamm wurden im darauffolgenden Schritt unter sterilen Bedingungen 25 ml eines vorgewärmten Mediums in einem 100 mm Schälchen zugefügt, dem kurz zuvor erst 1 %

Hepes 10 mmol/l zugeführt wurde. In diesem Medium wurden die Zellen bis zur Benutzung in einem Wärmeschrank unter Bedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

Zusammensetzung Inkubationsmedium

Medium 199

5 % FCS

1 % Penicillin Streptomycin

1 % Hepes 10 mmol/l

Für die Verifikation des Knock-In mittels PCR wurden von den Mäusen post mortem jeweils ein Stück Ohr und Schwanz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Unter weiterhin sterilen Bedingungen wurde ein Teil der gewonnenen Myozyten bei Bedarf aus dem Inkubator entnommen und den Messungen zugeführt.

Um die Messungen durchzuführen und die Myozyten damit in die Messanlage einzubinden, wurden zunächst vor jeder einzelnen Messung 4 µl Laminin in einer Konzentration von 0,5 mg/ ml mittig auf ein Deckgläschen aufgetragen. Dieses vorbehandelte Deckgläschen wurde in die Versuchskammer des Messanlagenmikroskops eingelegt und entsprechend innerhalb der Messkammer befestigt. Nach zwanzigminütiger Wartezeit wurden im darauffolgenden Schritt die abgenommenen Myozyten mit 0,3 ml Messtyrode auf die präparierten Deckgläschen übertragen; im Anschluss folgte wieder eine zehnminütige Ruhephase, um sicherzustellen, dass möglichst viele Myozyten am aufgetragenen Laminin haften bleiben.

3.1.4 Messanalagenaufbau und Messprotokoll

Die Kontraktions- und Fluoreszenzdaten wurden an dem Ion Optix Messplatz erhoben und mittels des Programms Ion Wizard dargestellt und gespeichert. Dabei wurden sowohl die NAD(P)H/FAD-Autofluoreszenz Messungen, als auch die mit fluoreszierenden Farbstoff

aufgezeichneten Signale unter Zuhilfenahme der Photomultiplier aufgenommen und im Computerprogramm IONWizard Version 6.3 gespeichert. Über die Kamera und die Software wurde zudem ein aktuelles Echtzeitbild am Bildschirm generiert, wodurch es möglich war parallel zu den Fluoreszenzmessungen die jeweiligen Sarkomerlängen und die prozentualen Sarkomerverkürzungen zu bestimmen. Bei allen Autofluoreszenz- und Farbstoffmessungen wurde entsprechend mittels einer UV-Lampe (Xenon Short Arc Lamp -75EX) angeregt. Die resultierende Emission wurde durch die Photomultiplier detektiert und durch das Epifluoreszenzmikroskop (Nikon Ti-S/L100) abgebildet.

Indikator	Parameter	λ exc (nm)	λ em (nm)
NAD(P)H	NAD(P)H	340	450
FAD	FAD	485	525
MitoSOX	$\cdot\text{O}_2^-$ in Mitochondrien	390	580
Indo-1 (AM)	$[\text{Ca}^{2+}]_c$	340	405/ 485
TMRM ⁺	$\Delta\Psi_m$	540	605/ 508
SBFI (AM)	$[\text{Na}^+]_i$	340/ 380	505
DCF	ROS (überwiegend H_2O_2)	480	520

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und deren Lichtemissionen. NAD(P)H und FAD bzw. Indo-1 und TMRM⁺ wurden von einem gemeinsamen Farbstoff gleichzeitig gemessen. λ exc Anregungswellenlänge, λ em Emissionswellenlänge.

Bei den Autofluoreszenzmessungen wurden NAD(P)H ($\lambda_{\text{exc}}=340\text{nm}$) und FAD ($\lambda_{\text{exc}}=485\text{nm}$) durch zwei sich abwechselnde Filter (D340/12x und S490/20x) jeweils alle vier Sekunden im Wechsel angeregt. Die Lichtweiterleitung erfolgte in Abhängigkeit des jeweiligen Messsubstrats (NAD(P)H oder FAD) innerhalb des Mikroskops.

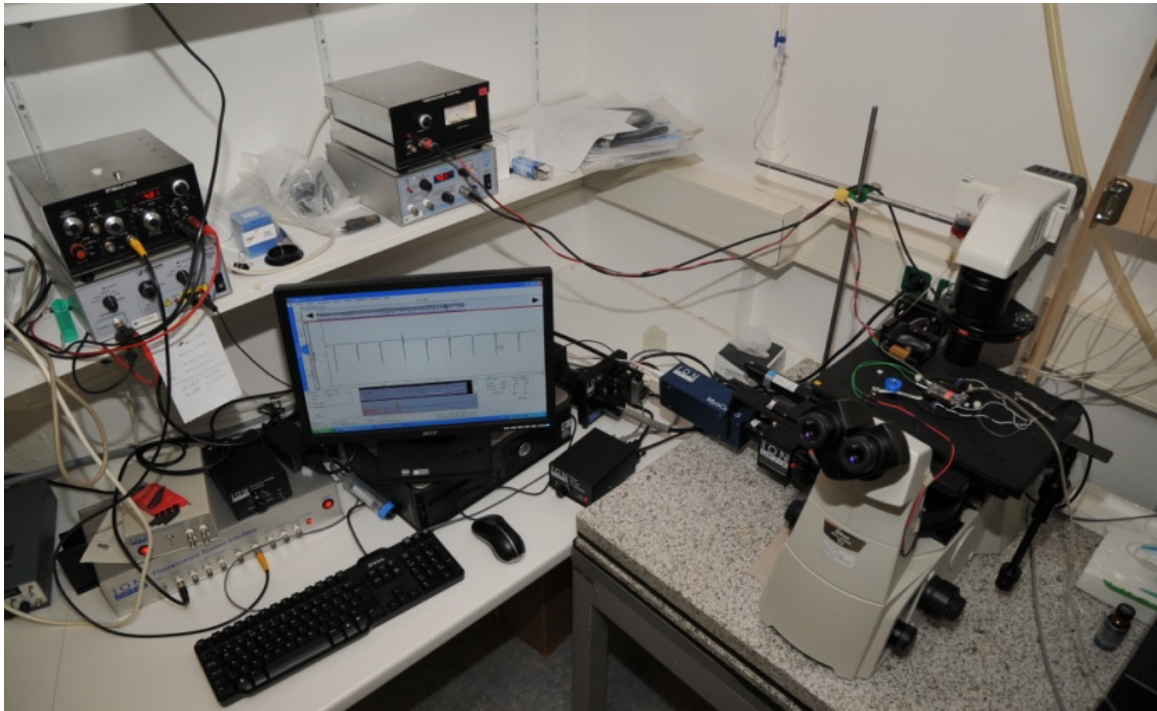


Abbildung 12: Gesamter Messarbeitsplatz mit IonOptix Anlage. zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung.

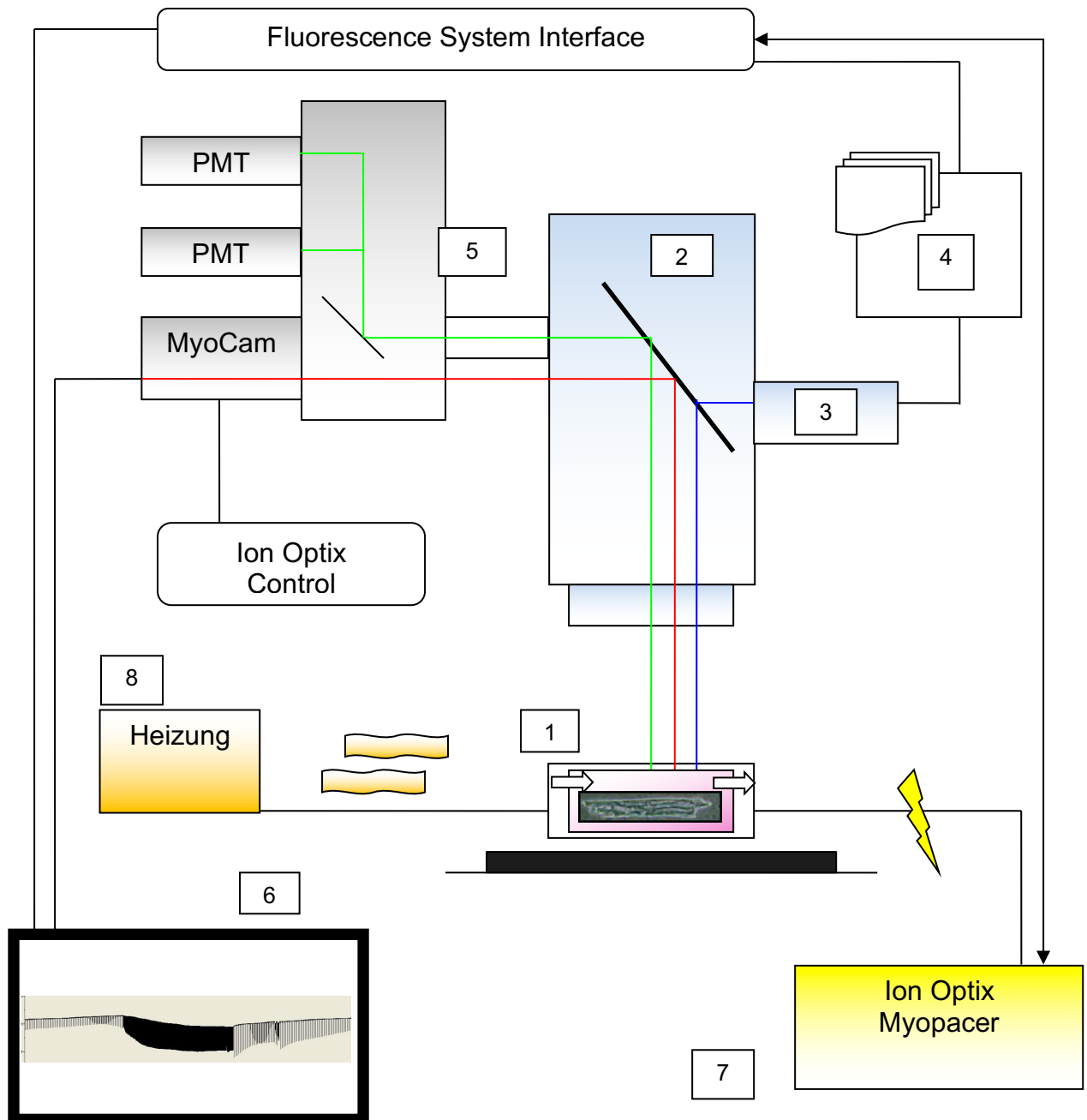


Abbildung 13: Schematische Darstellung der IonOptix Anlage zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung. Die Linien zeigen die Verbindung der einzelnen Komponenten an.

1 Objektkammer auf Mikroskoptisch mit präparierten Myozyten und Ein- und Ausfluss. 2 Mikroskopgehäuse mit inversem Mikroskop, 45° ausgerichteten Spiegeln und Lampe zur Myozytendarstellung und Sarkomermessung, rote Linie Strahlengang (Durchlicht), Emissionslicht der Farbstoffe grüne Linie. 3 Lichtleitereinkoppler als Teil des Mikroskops, Anregungslicht blaue Linie. 4 Xenon Arc Lamp mit IonOptix μ Step und Filter Rad mit 6+1 Filter. 5 Zell-Frame-Adapter, bestehend aus drei Würfeln. Im ersten befindet sich ein 650 Long-Pass (LP) Spiegel und die MyoCam; im zweiten ein weiterer LP-Spiegel und der erste Photomultiplier (PMT). Im dritten ein weiterer LP-Spiegel und die PMT zwei und drei. 6 Computer mit Programm IonWizard von IonOptix. 7 Elektrisches Stimulationsgerät zum kontrollierten Pacing der Myozyten mit vorgegebener Frequenz; koppelt direkt in das Fluorescence System Interface ein. 8 Heizung zum kontinuierlichen Temperaturerhalt für die Messbedingungen.

Zur Detektion des SBFI-Signals wurde ein anderer Filter $D360 \pm 15$ verwendet, der ebenfalls der Xenon Arc Lampe nachgeschaltet wurde. Sowohl bei den Messungen von NAD(P)H/FAD, als auch bei der Aufzeichnung der SBFI Signale wird das von der Xenon Arc Lampe gefilterte Licht auf einen dichroischen Spiegel (NAD(P)H/FAD: 89017bs F/TR; SBFI: 400DCLP) weitergeleitet. Hierdurch wurden die Farbstofffluoreszenzen innerhalb der Myozyten angeregt, wodurch die Zellen via Emission Licht abgaben. Dieses neu generierte Licht wurde zusammen mit dem Durchlichtstrahlengang des Mikroskops auf einen weiteren Spiegel (650DCXR) vor der Myocam-S geleitet. An dieser Stelle durchdrang das Durchlicht den Filter in Richtung Myocam-S, während das neu generierte, emittierte Licht mit $\lambda > 650$ nm über den Filter in die Photomultiplier weitergeführt wurde. Auch hier gab es Unterschiede in der endgültigen Aufzeichnung der beiden Messsetups.

Bei den NAD(P)H/FAD Messungen wurde hier das emittierte Licht auf den ausschließlich $\lambda > 490$ nm passierenden Spiegel 490DCLP zugeleitet. Alle anderen kürzeren Wellenlängen wurden dem PMT1 übermittelt; hier wurde ausschließlich die NAD(P)H Fluoreszenz über den Filter D435/35 zur genaueren Signaleinschränkung ($\pm 17,5$ nm) geführt, bevor es endgültig aufgezeichnet wurde. FAD hingegen wurde über den vorgeschalteten Filter D525/30x im PMT2 aufgenommen, dem zuvor über den Spiegel 490DCLP alle Wellenlängen > 490 nm zugeleitet worden waren. Bei der Detektion der SBFI-Emissionen wurde über den vorgeschalteten Filter D510/30M alleinig der PMT2 genutzt.

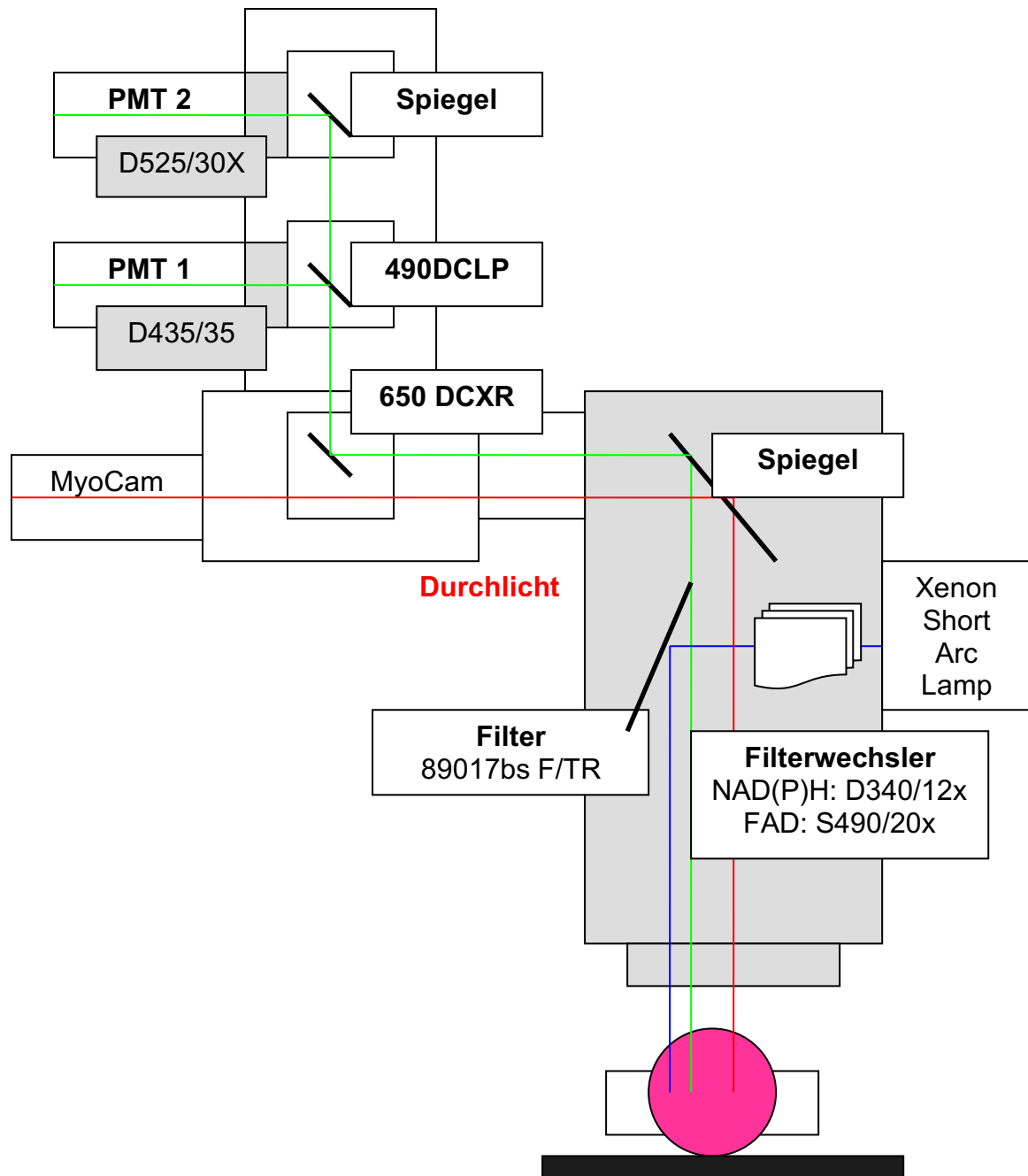


Abbildung 14: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H /FAD⁺. Schematische Anordnung der Lichtquelle, Filterwechsler, dichroischen (DC) Spiegel, Band-Pass Filter und Photomultiplier Röhren (PMT) zur Messung der (Auto-) Fluoreszenzen von NAD(P)H und FAD sowie der Zellverkürzung. Die Zahlen neben der Anlage bezeichnen die entsprechend eingebauten Filter.

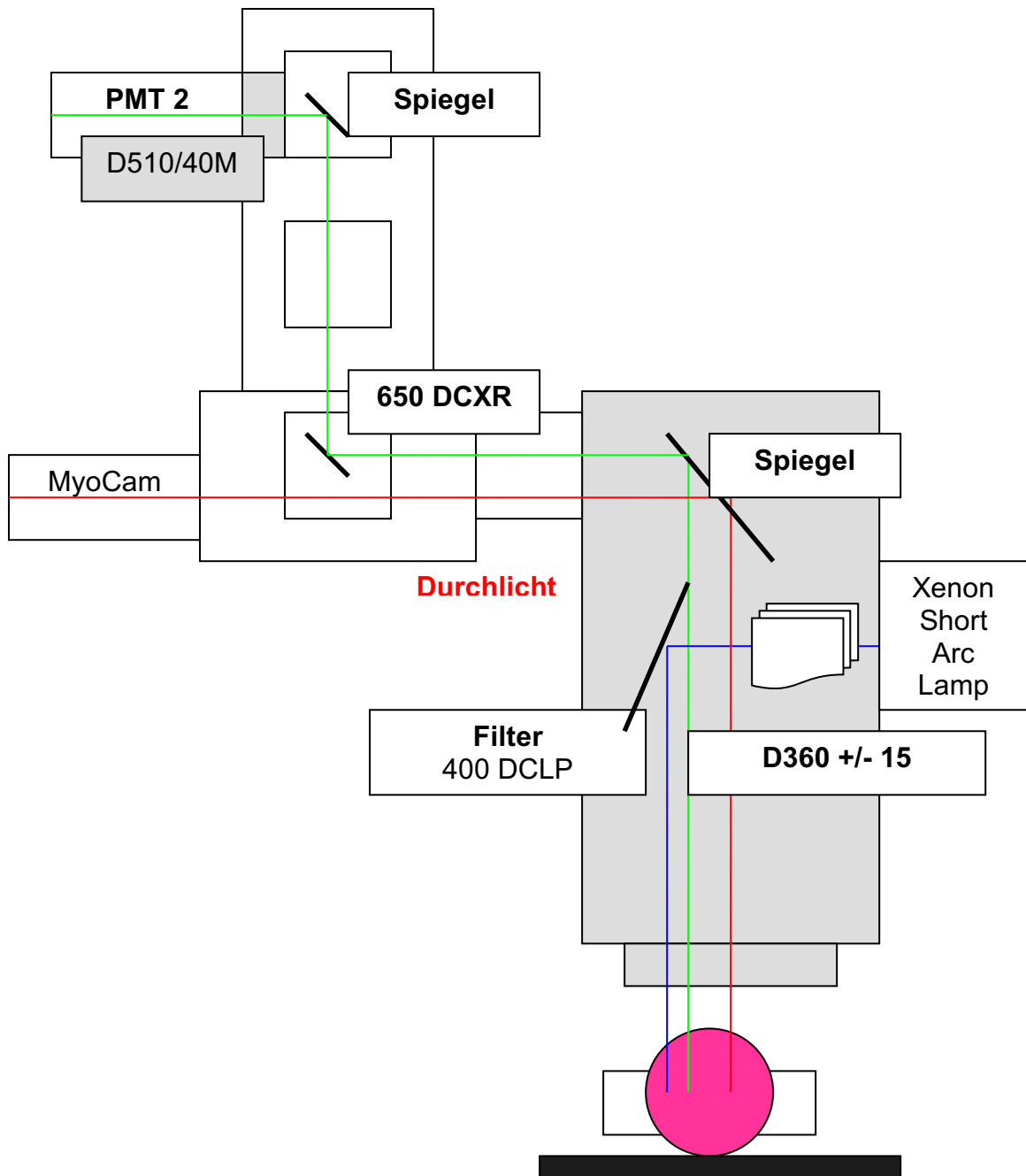


Abbildung 15: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von SBF. Schematische Anordnung der Lichtquelle, Filterwechsler, dichroischen (DC) Spiegel, Band-Pass Filter und Photomultiplier Röhren (PMT) zur Messung der Fluoreszenz des Na⁺-Farbstoffs SBF sowie der Zellverkürzung. Die Zahlen neben der Anlage bezeichnen die entsprechend eingebauten Filter.

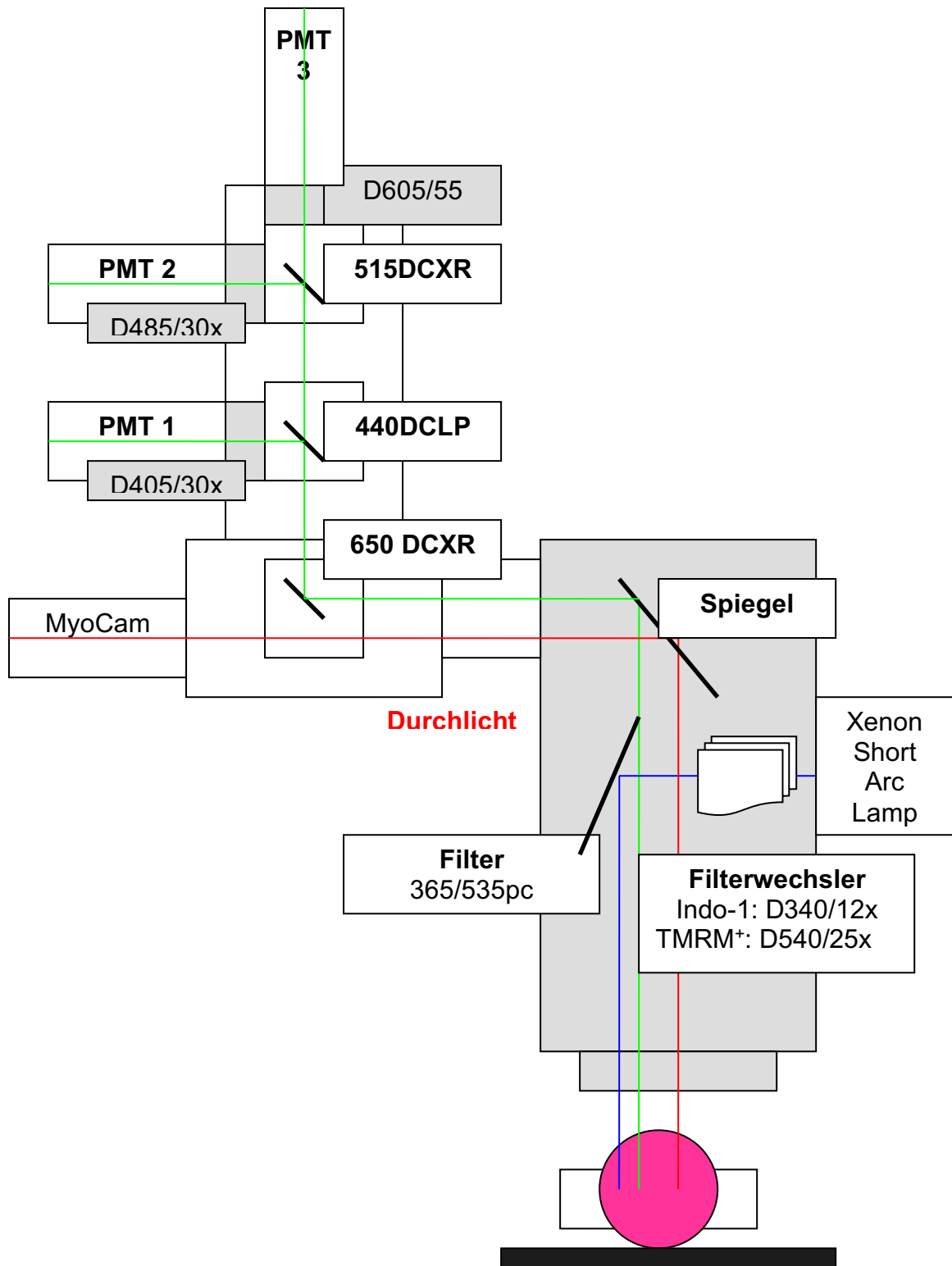


Abbildung 16: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von Indo-1/TMRM⁺. Schematische Anordnung der Lichtquelle, Filterwechsler, dichroischen (DC) Spiegel, Band-Pass Filter und Photomultiplier Röhren (PMT) zur Messung der Fluoreszenzen von Indo-1 und TMRM⁺ sowie der Zellverkürzung. Die Zahlen neben der Anlage bezeichnen die entsprechend eingebauten Filter.

Analog zu den Messungen von NAD(P)H /FAD konnten auch die Signale von $[Ca^{2+}]_c$ mittels Indo-1 und des Membranpotentials mittels TMRM⁺ gleichzeitig aufgezeichnet werden. Die gemessene Superoxidproduktion mittels MitoSOX wurde zudem in einem ähnlichen Setup durchgeführt.

Die Myozyten wurden innerhalb dieser Mess-setups ebenfalls mit der Xenon Short Arc Lampe angeregt. Das nachgeschaltete Filterset wurde dementsprechend an die zu messenden Parameter angepasst (TMRM⁺: D540/25x, Indo-1: D340/12x). Die daraus resultierenden Anregungswellenlängen wurden über einen weiteren Filter (365/535pc) auf das Objekt zurückgeleitet und dadurch wiederum per Fluoreszenz Emission erzeugt. Gleichzeitig wurde auch hier das mit Hilfe der Lampe und dem Filter T660LPXR ein UV-Strahlen tragendes Durchlicht erzeugt.

Das emittierte Licht wurde zusammen mit dem Durchlicht über einen dichroitischen Spiegel (650DCXR) weitergeleitet und in einem Brechungswinkel von 45° zum Strahleneinfall auf die Myocam-S (Durchlicht) und den Photomultipliern (Emissionslicht) geführt. Das Emissionslicht wurde hier wiederum auf den Spiegel 440DCLP geführt, der ausschließlich für Licht $\lambda > 440$ nm durchgängig war. Alle kürzeren Wellenlängen wurden dementsprechend auf den PMT1 gespiegelt. Das durchgehende Licht traf auf einen weiteren zweiten PMT Spiegel (515DCXR), durch den ausschließlich Licht mit einer Wellenlänge > 515 nm passieren konnte. Die nicht durchgängigen Wellenlängen wurden analog zum ersten PMT-Filter in den PMT2 weitergeleitet. Vor allen PMTs war ein dementsprechend ausgewählter Filter vorgeschaltet (PMT1: D405/30x; PMT2: D485/30x; PMT3: D605/55). Das Mess-Setup der MitoSOX-Aufzeichnungen beinhaltete zudem die Besonderheit, dass alleinig mit dem PMT3 innerhalb der Photomultiplier Röhren gemessen wurde.

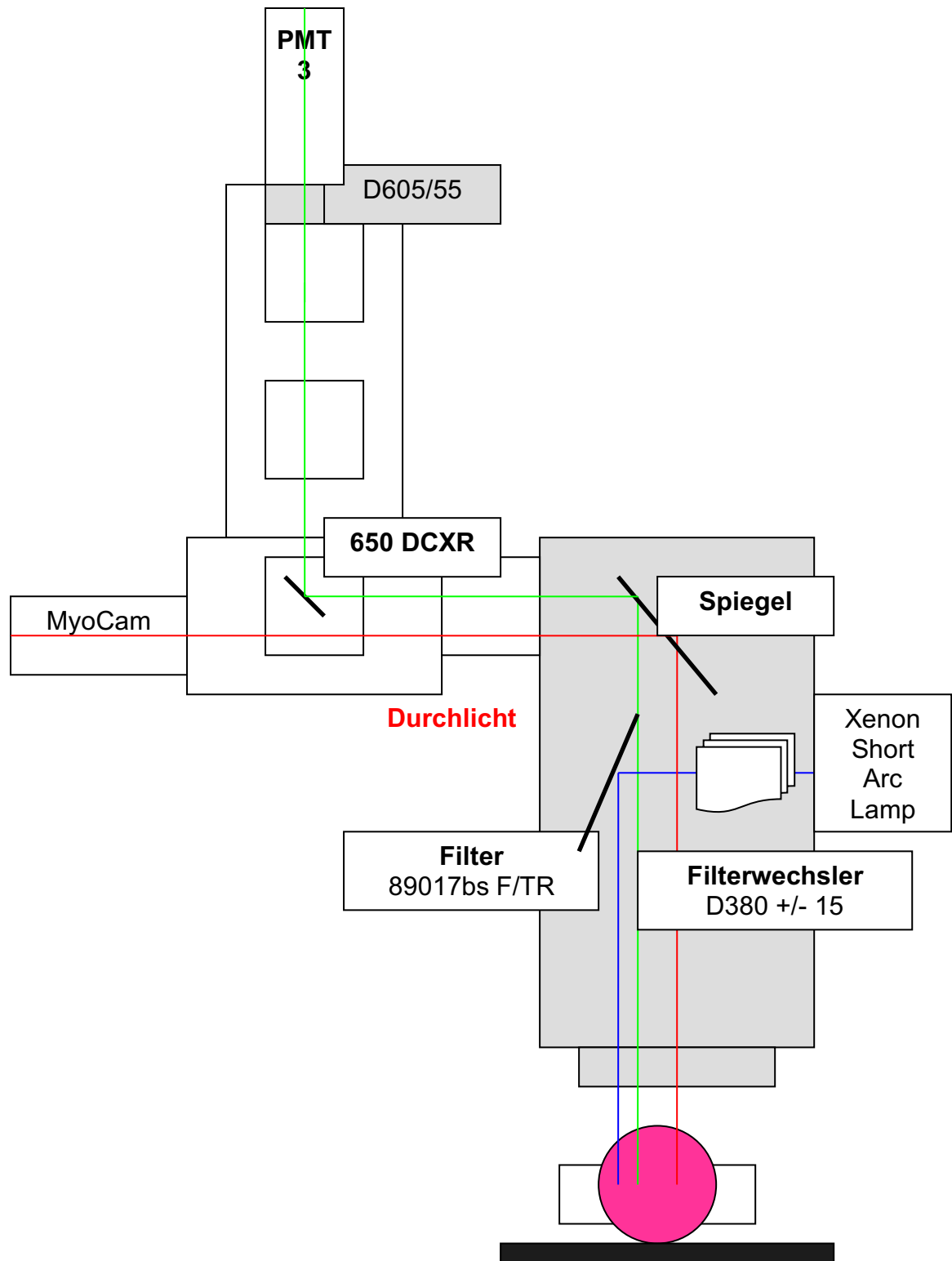


Abbildung 17: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von MitoSOX. Schematische Anordnung der Lichtquelle, Filterwechsler, dichroischen (DC) Spiegel, Band-Pass Filter und Photomultiplier Röhren (PMT) zur Messung der Fluoreszenzen von MitoSOX sowie der Zellverkürzung. Die Zahlen neben der Anlage bezeichnen die entsprechend eingebauten Filter.

Unabhängig der jeweiligen Messungen und verwendeten Farbstoffe wurden diese durch die PMTs detektierten Lichtsignale folglich in Spannung umgewandelt, welche anschließend dem Fluoreszenz System Interface der Firma IonOptix zugeführt wurde. Diese Spannung wurde hier mit Hilfe des Programms IonWizard visualisiert und am Bildschirm des Computers dargestellt.

Über die Myocam-s wurde das Durchlicht ($\lambda > 630 \text{ nm}$) einen dazu genutzt, die Myozyten am Bildschirm in Echtzeit darzustellen, zum anderen auch um die einzelnen Sarkomerverkürzungen aufzuzeichnen.

Innerhalb des in der Arbeitskammer befindlichen Kollektivs an Myozyten wurde jeweils eine sich gut darstellende Zelle ausgewählt und über das Mikroskop Okular scharf dargestellt. Über zu allen vier Seiten hin angrenzende Blenden wurden Störsignale ausgeblendet und sichergestellt, dass ausschließlich die Fluoreszenzen der einzelnen, selektierten Myozyte dargestellt wurden.

Sowohl die Lösungen als auch die Messkammer wurden präexperimentell beheizt, sodass die Messungen bei 37°C stattfinden konnten. Das Thermometer hatte keinen Einfluss auf den Programmstart.

Die innerhalb des etablierten Protokolls verwendeten Lösungen wurden in die jeweiligen Gefäßbehälter einer sich höher befindenden Anlage gefüllt, bevor sie per Schwerkraft durch installierte Schläuche der Messkammer zugeleitet wurden. Jede zuvor angesetzte Lösung besaß im Mess-Setup dementsprechend ein eigenes Zuleitungssystem bis zum Mikroskoptisch.

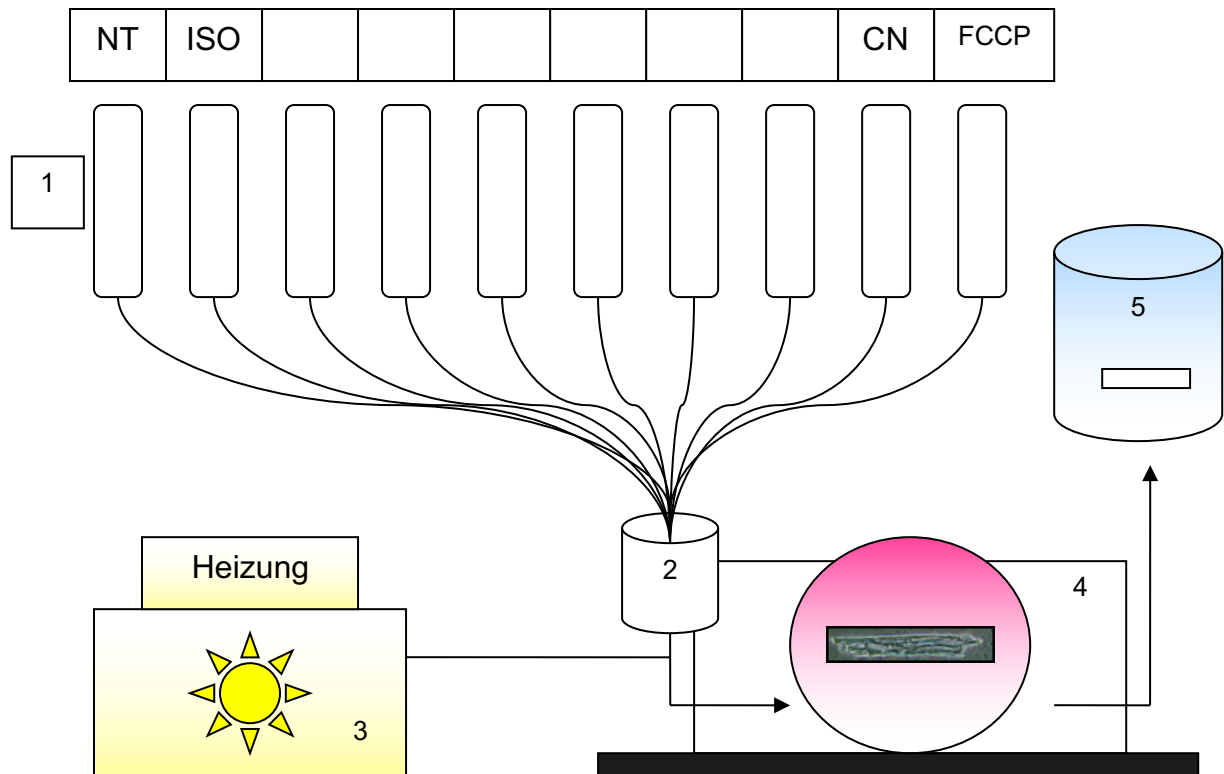


Abbildung 18: Schematische Darstellung des zu- und abführenden Leitungssystems und der Einbindung der präparierten Myozyten. 1 Zuführende Lösungsbehälter oberhalb der Messkammer. 2 Sammelkammer aller zugeführten Lösungen. 3 Heizung. 4 Messkammer mit Myozytenlösung. 5 Vakuumpumpe mit Negativsog und auffangendem Behälter.

Um eine kontinuierliche Zufuhr der verwendeten Lösungen an die sich in der Messkammer befindenden Myozyten zu gewährleisten wurde ein permanenter Flüssigkeitsstrom über den Zellen generiert. Hierzu wurde zum einen eine konstante Flüssigkeitszufuhr durch an den Gefäßbehältern installierten Tropfenzähler sichergestellt. Zum anderen wurde das Abfließen der Flüssigkeit durch einen fortdauernden Sog einer am anderen Ende der Messkammer angeschlossenen Vakuumpumpe erreicht.

Die zugeführte Normaltyrode (NT) setzte sich bis auf eine Ausnahme bei allen Messprotokollen gleich zusammen (siehe Tabelle 4). Bei den MitoSox-Messungen und den DCF Messungen wurden demnach auf die antioxidativen Substanzen Pyruvat und Ascorbinsäure verzichtet.

Zusammensetzung der Normaltyrode (NT)

NADPH/ FAD// Indo-1// TMRM⁺// SBF1	MitoSox// DCF
NaCl 130 mmol/L	NaCl 130 mmol/L
KCl 5 mmol/L	KCl 5 mmol/L
MgCl ₂ 1 mmol/L	MgCl ₂ 1 mmol/L
Na-Hepes 10 mmol/L	Na-Hepes 10 mmol/L
Glukose 180,16 mmol/L	Glukose 180,16 mmol/L
CaCl ₂ 1 mmol/L	CaCl ₂ 1 mmol/L
Na-Pyruvat 2 mmol/L	
Ascorbinsäure 0,3 mmol/L	

Tabelle 4: Zusammensetzung der Normaltyrode für die jeweiligen Messungen.

Nachdem die Inhaltsstoffe NaCl, KCl, MgCl₂, Na-Hepes, Na-Pyruvat, Ascorbinsäure und Glukose in Aqua dest. vollständig gelöst wurden, stellten wir den pH-Wert mit einem pH-Meter mit Hilfe von 1M HCl/ 1M NaOH auf 7,5 ein. Abschließend wurde CaCl₂ hinzugegeben.

	Messprotokoll			Kalibrierung			
	NT	ISO		FCCP		CN	
Parameter/ Fluoreszenz	1	2	3	4	5	6	7
NADH/ NADPH/ FAD	NT	50 ml NT + ISO (10 nM)		50 ml NT + 5 µl FCCP	50 ml NT + 10 mgHCN		
MitoSOX	NT			50 ml NT + 15 µl Antimycin			
DCF	NT			H ₂ O ₂ anstatt FCCP			
Indo-1 TMRM	NT						
SBFI	NT		0 mM Na ⁺	10 mM Na ⁺	20 mM Na ⁺	40 mM Na ⁺	145 mM Na ⁺

Tabelle 5: Zusammenfassung und Konzentrationen der unmittelbar an den gemessenen Myozyten verwendeten Lösungen. Die Kalibrierung bei SBFI wurde mit Hilfe verschiedener, ansteigender Natriumkonzentrationen erreicht. Bis auf Antimycin A (Ethanol) wurde alle anderen Lösungen in NT bzw. Aqua dest. gelöst.

Das bei allen Parametern gleich verwendete Messprotokoll begann mit einer 60 sekündigen Stimulationsphase unter 0,5 Hz bei gleichzeitig konstant zugeführter Normaltyrode. Die im nächsten Schritt durchgeführte Simulation einer physiologischen Arbeitslast setzte sich aus

zwei Komponenten zusammen. Zum einem wurde anstelle der NT das β -AR stimulierende Isoprenalin zugeführt, zum anderen wurde die Stimulationsfrequenz von 0,5 auf 5 Hz erhöht und damit verzehnfacht. Ziel war es, eine Situation *in vivo* zu schaffen, die eine physiologische Stresssituation im Sinne einer gesteigerten körperlichen Aktivität nachahmte (Kass et al., 1998).

Bereits vor dieser beschriebenen simulierten Stresssituation wurde schrittweise Isoprenalin eingewaschen. Erst wenn anhand der abgelesenen Kontraktionskraft und deren Anstieg ein signifikant konstant erhöhtes Niveau erreicht und damit sichergestellt wurde, dass der β -stimulierende Agonist zu wirken beginnt, wurde die Stimulationsfrequenz angehoben. Die in der Folge stattfindende Stressphase unter einer Kontraktionsfrequenz von 5 Hz dauerte ebenfalls in allen durchgeführten Protokollen 60 Sekunden. Dieser fügte sich stets ein abschließendes Intervall an, bei dem Isoprenalin mit NT unter rezidivierender Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz wieder ausgewaschen wurde.

Während sich das wesentliche Messprotokoll bei allen zu messenden Farbstoffen gleich zusammensetzte, wurde die Kalibrierung different durchgeführt. Im Rahmen der Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FAD wurde ein Entkoppler der Atmungskette (FCCP, 5 μ M) und Zyanid (4 mM) verwendet. FCCP, das unter oxidativer Phosphorylierung eine nahezu komplette mitochondriale Entkopplung zur Folge hat, eine vollständige Oxidation und damit ein absoluter Nullwert des mitochondrialen Redoxstatus erreicht (0% NADH, 100% NAD⁺; 100% FAD, 0% FADH₂). Anschließend wurde mit dem Atmungskettenhemmer Zyanid eine absolute Reduktion des Redoxstatus bzw. ein nahezu einhundertprozentiger Absolutwert des Redoxstatus erzielt (100% NADH, 0% NAD⁺; 0% FAD, 100% FADH₂). Erst wenn unter beiden Kalibrierungsschritten ein vollständig stabiles Plateau der Fluoreszenzen erreicht wurde, wurde der nächste Schritt eingeleitet.

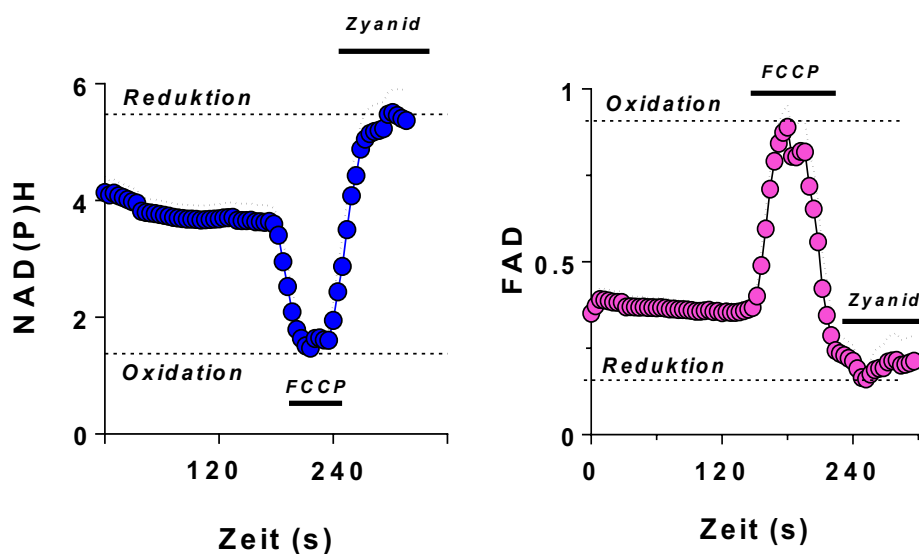


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der Kalibrierung der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD. Am Ende eines jeden Experimentes wurden die Signale durch komplette Oxidation durch FCCP und Reduktion durch Zyanid kalibriert und quantifiziert (Modifiziert nach Nickel et al., 2015a).

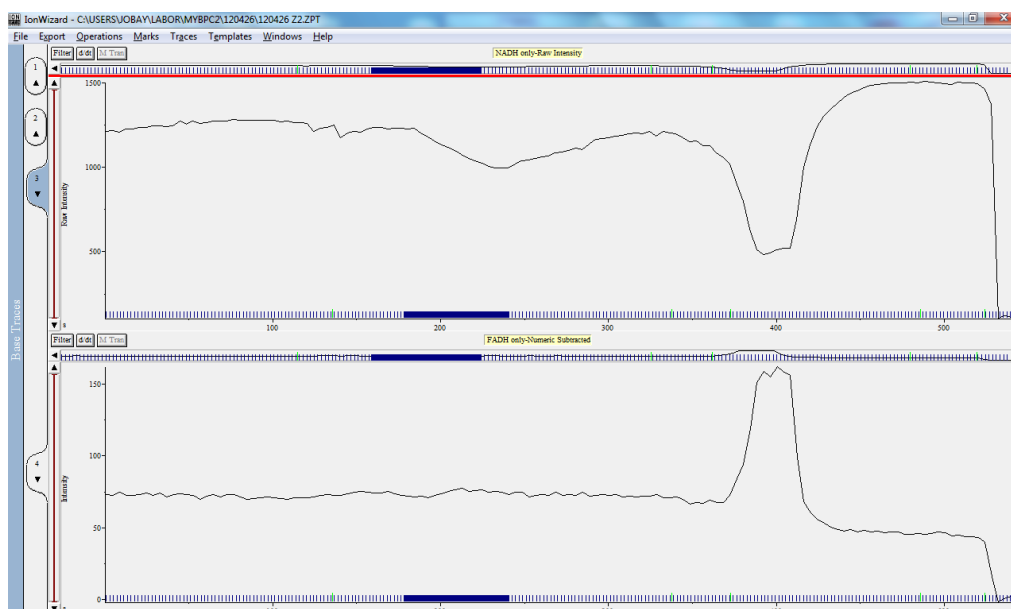


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung eines NAD(P)H (oben) und FAD (unten) Protokolls in IonWizard. Dargestellt sind die jeweiligen Signalstärken (y-Achse) und die Zeit (x-Achse). In der rechten Bildhälfte beispielhafte Darstellung der Kalibrierung mit kompletter Oxidation durch FCCP und Reduktion durch Zyanid. Gegenläufiger Verlauf der beiden Messparameter.

Im Falle der MitoSOX Messungen wurde mit Antimycin A (150 μM) ein Komplex III-Hemmer der Atmungskette genutzt. Damit konnte eine nahezu 100 %ige Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffs und zudem eine maximale Positivkontrolle bis zum endgültig sichtbaren Zelltod (starke Kontraktion; nicht-stabförmige Konfiguration; Verschwinden der Querstreifung) und damit dem definierten Messendpunkt erreicht werden.

Bei den SBFI-Messprotokollen wurde die Kalibrierung unter Zuhilfenahme verschiedener, zuvor angesetztter Na^+ -Lösungen durchgeführt. Dabei konnte durch die klar definierten, in unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen zugegebenen Lösungen konsekutiv auf die verschiedenen Eichwerte geschlossen werden. Zu Beginn wurde eine komplett Natrium-freie Lösung (0mmol/L) eingewaschen, um einen Nullwert zu generieren. Fortan wurde die Na^+ -Konzentration schrittweise mit 0, 10, 20, 40 und 145 mM unter gleichzeitigem Abwarten eines stabilen Messsignalniveaus bis auf 145 mmol/L erhöht. Um eine quantitative Aussage über die Natriumwerte treffen zu können, wurde am Computer zunächst eine Ratio der sich gegensätzlich verhaltenden Emissionen der Anregungswellen von $\lambda = 340$ und 370 gebildet. Durch die jeweils bei 340 bis 370 nm detektierten Fluoreszenzen, konnte für jede Na^+ -Konzentration eine zugehörige 340/370 Ratio aufgezeichnet werden. Diese wurde gegen die Natriumkonzentration der jeweiligen Lösung aufgetragen und die intrazelluläre Natriumkonzentration ermittelt. Indem wir das ratiometrisch ermittelte Signal anhand verschiedener natriumhaltiger Lösungen kalibrierten erhielten wir somit absolute Konzentrationswerte.

Hierzu wurde zusätzlich durch die ebenfalls konstant zugeführten Ionophoren Gramicidin und Monensin, sowie dem Na^+ - K^+ -Austauscher-Inhibitor Stophanthidin sichergestellt, dass die internen und externen Na^+ -Spiegel gleich waren. Normalerweise unterscheiden sich die intrazellulären Na^+ Konzentrationen physiologisch von den extrazellulären. Abbildung 21 zeigt hier eine exemplarische Darstellung eines einzelnen Messprotokolls mit den unterschiedlichen Anregungswellen und den simultanen Aufzeichnungen der Zellverkürzung.

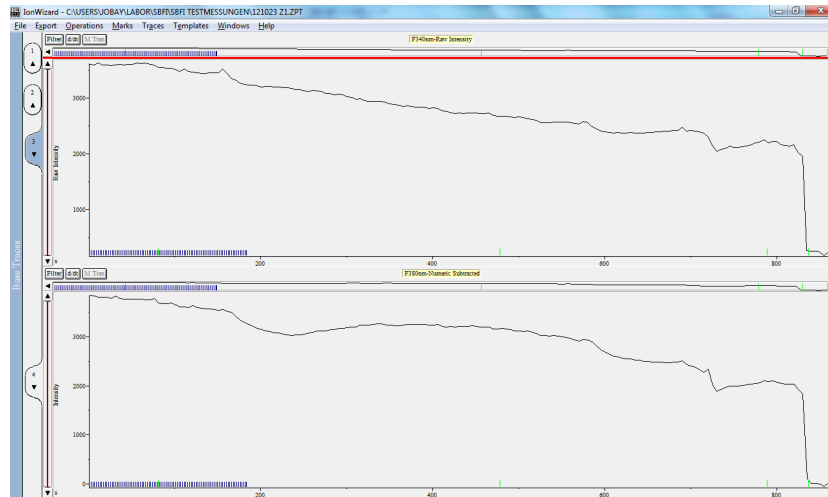


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung eines SBFI-Messprotokolls zur Aufzeichnung der intrazellulären Na^+ -Konzentration mit Kalibrierung am Ende der Messung. Exzitation bei 340 nm mit Emission bei 505 nm (oben) und Exzitation bei 370 nm mit Emission bei 505 nm (unten). Erstellt mit dem Programm IonWizard der Firma IonOptix. Die gleichzeitigen Messungen des NAD(P)H-Signals sind hier nicht dargestellt.

Abbildung 22 stellt eine beispielhafte Kalibrierung des SBFI-Signals unter Verwendung definierter Natriumkonzentrationen dar.

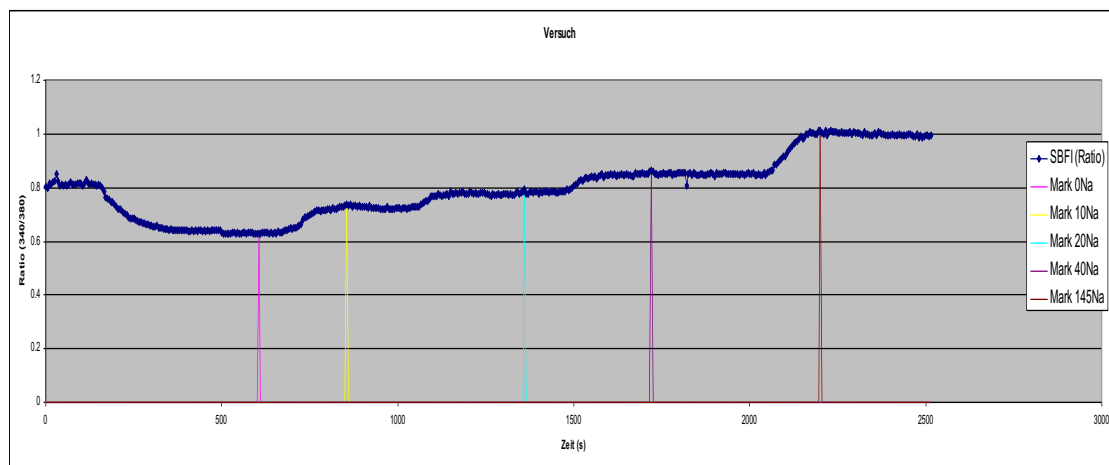


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung einer SBFI-Kalibrierung in Windows Excel. Das errechnete Signal der SBFI-Ratio (blaue Linie) wird durch die Messung der Kalibrierungslösungen mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen ermittelt. 0 mM Na^+ (rosa), 10 mM Na^+ (gelb), 20 mM Na^+ (türkis), 40 mM Na^+ (violett) und 145 mM Na^+ (rot). Erst wenn ein stabiles Signal und Plateau zu der jeweiligen Konzentrationslösung erreicht ist, wird die nächste Konzentration eingespült.

Zusammensetzung der Na⁺-Lösungen zur Kalibrierung von SBFI

Substanz	Konzentrationen				
	0 mM	10 mM	20 mM	40 mM	145 mM
KCl	30 mM	27,9 mM	25,9 mM	21,7 mM	
K-Gluconat	115 mM	107,1 mM	99,1 mM	83,3 mM	
Hepes	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
EGTA	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
NaCl		2,1 mM	4,1 mM	8,3 mM	30 mM
Na-Gluconat		7,9 mM	15,9 mM	31,7 mM	115 mM
Gramicidin	2 µM	2 µM	2 µM	2 µM	2 µM
Monensin	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM
Strophanthidin	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM

Tabelle 6: Konzentrationen der eingesetzten Na⁺ Lösungen. Gramicidin, Monensin und Strophanthidin wurden zuvor laut Herstellerangaben gelöst.

Innerhalb des Messprotokolls von Indo-1 und TMRM wurde hingegen keine Kalibrierung vollzogen. Die [Ca²⁺]_i-Messungen wurden mit dem ratiometrischen Farbstoff Indo-1 durchgeführt, bei beiden Protokollen wurden zur Auswertung qualitative Veränderungen des Fluoreszenzsignals und keine absoluten Werte genutzt.

Zusammenschau der Messprotokolle





	Messprotokoll				Kalibrierung				
Pacing	0,5 Hz	0,5 Hz	5 Hz	0,5 Hz	0,5 Hz				
Lösung	NT	ISO	ISO	NT					
Zeit	60 s	bis Wirkeintritt	60 s	60 s					
NAD(P)H FAD					FCCP	CN	NT		
MitoSOX					Antimycin A				NT
Indo-1 TMRM ⁺									
SBFi					0 mM Na ⁺	10 mM Na ⁺	20 mM Na ⁺	40 mM Na ⁺	145 mM Na ⁺ NT



Tabelle 7: Übersicht der Messprotokolle der Fluoreszenzmessungen von NAD(P)H, FAD, MitoSOX, Indo-1, TMRM⁺ und SBFi und exemplarische Messdarstellung. Jedes Protokoll startet mit einer Anfangsstimulation von 0,5 Hz unter kontinuierlicher Zugabe von NT (60s). Anschließend Wechsel von reiner NT auf ISO (10 mM) und warten auf Wirkeintritt. Bei erkennbarer erhöhter Zellverkürzung Beginn der Stressphase mit 5 Hz und weiterhin Zufluss von ISO, abschließendes Auswaschen von ISO mit NT bei wieder angewandtem Pacing unter 0,5 Hz. Die unterschiedlichen Kalibrierungen der Fluoreszenzfarbstoffe fanden unter kontinuierlicher 0,5 Hz-Stimulation statt.

3.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Die genutzten Fluoreszenzfarbstoffe nahmen einen zentralen Bestandteil unserer Experimente ein. Insgesamt zeichneten wir die Autofluoreszenzen von NADH, NADPH und FAD, die mitochondriale Superoxidproduktion per Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX, das intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration mit Hilfe von Indo-1, das mitochondriale Membranpotential via TMRM⁺ und das intrazelluläre freie Na^+ per SBFI auf. Zudem wurde während jedes Messprotokolls die Sarkomerlänge gemessen.

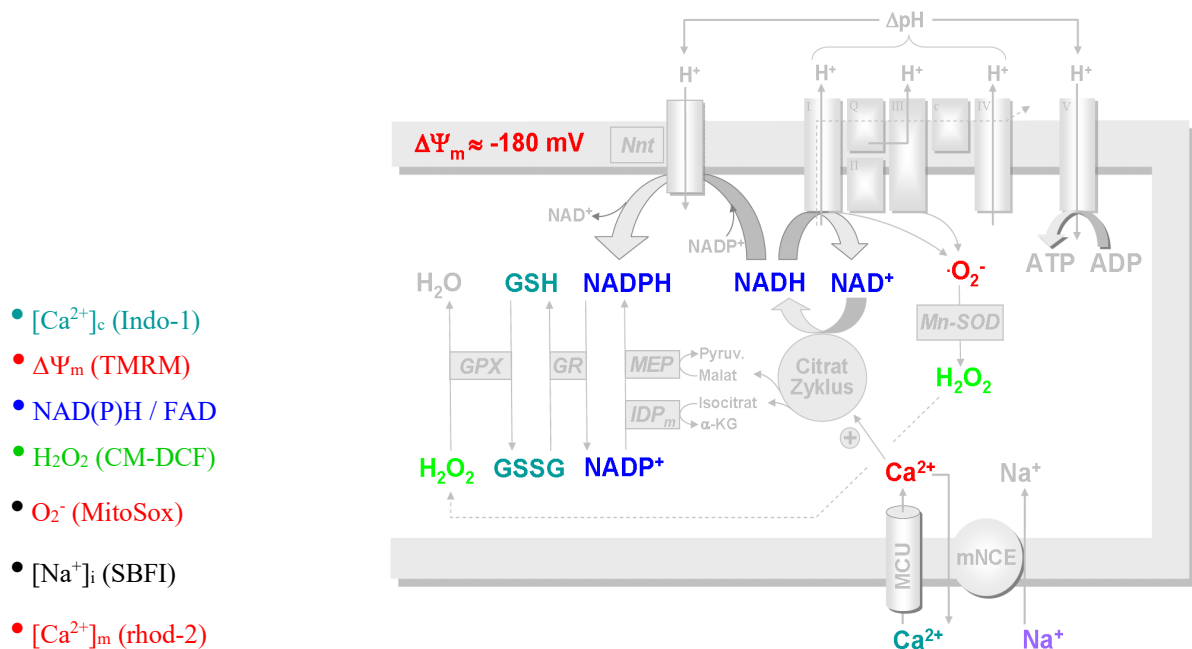


Abbildung 23: Übersicht über die unterschiedlichen Parameter der Messprotokolle (nach Maack and O'Rourke, 2007).

Um eine Aussage zum mitochondrial-metabolischen Haushalt der Myozyten treffen zu können wurde synchron zu den NAD(P)H - Autofluoreszenzen auch FAD gemessen, das selbst wiederum die oxidierte Form des FADH_2 darstellt.

Als Hauptdonator von Elektronen der mitochondrialen Atmungskette stellt NADH, eng gebunden an den Komplex I, einen wesentlichen Regulationsmechanismus des intra- und

extrazellulären pH-Milieus dar; das an Komplex II geknüpfte FADH_2 ist ähnlich zu NADH ein Donor von Elektronen an der Atmungskette.

Die Messmethode der Autofluoreszenzen bietet sich demnach sehr gut als messbarer Indikator an, da es zum einem nicht-invasiv misst, zum anderen die metabolischen Veränderungen während der Messprotokolle direkt aufzeichnet. Zum einem wird die physikalische Eigenschaft von entweder bereits gebundenem oder reduziertem NADH genutzt, Licht bei ca. $\lambda = 340 \text{ nm}$ aufzunehmen und gleichzeitig bei ungefähr $\lambda = 450 \text{ nm}$ unter einer blau fluoreszierenden Emission abzugeben. Im Gegensatz zu NADH emittiert NAD^+ als oxidierte Form nicht signifikant. Anhand der Signalstärke des fluoreszierenden blauen Lichts kann somit ein Rückschluss auf die vor allem mitochondriale, aber auch zytosolische Menge an NAD(P)H gezogen werden (Eng et al., 1989). Gleichzeitig wurden sich ebenfalls die physikalischen Eigenschaften von FAD zu Nutze gemacht, das maximal bei $\lambda = 525 \text{ nm}$ emittiert, während FADH_2 praktisch keine messbaren Fluoreszenzen abgibt. Zuvor wurde die Autofluoreszenz des FAD bei $\lambda = 485 \text{ nm}$ angeregt.

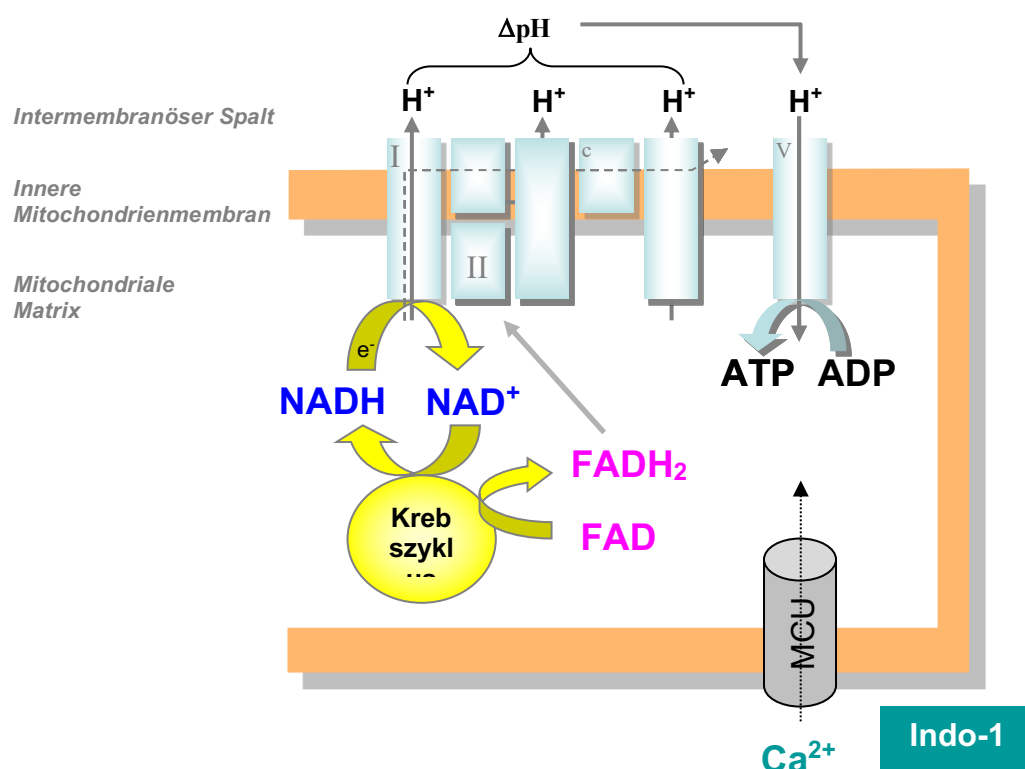


Abbildung 24: Messorte von NADH und FADH_2 als primäre Elektronenquelle an der Atmungskette und Indo-1. Der entstehende Protonengradient über der inneren mitochondrialen Membran stellt die Treib-Kraft für die ATP-Produktion an der F_1/F_0 ATPase dar (Modifiziert nach Maack and O'Rourke, 2007).

Durch die nun detektierten Werte von reduziertem NADH und oxidiertem FAD konnte nun konsekutiv eine sensitive Schlussfolgerung auf den Redoxstatus, dem Oxidations- bzw. Reduktionsstatus der Zelle gezogen werden. Der durch das Dividieren der sich gegensätzlich verhaltenden Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD ratiometrisch errechnete Wert war umso niedriger, je oxidiierter und damit metabolisch aktiver sich der mitochondriale Redoxstatus darstellte (Skala & Ramanujam, 2010).

Die Aufzeichnung der MitoSOX-Fluoreszenzen diente der Detektion der Superoxidproduktion innerhalb der Mitochondrien, der intrazellulär größten Syntheselieferanten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Im Rahmen der Messungen der MitoSOX-Fluoreszenzen mussten die Myozyten im Gegensatz zu den Autofluoreszenzen von NAD(P)H/FAD präexperimentell einer Färbung unterzogen werden. Der sich demnach ausschließlich intramitochondrial akkumulierende Farbstoff wurde bei ca. $\lambda = 510$ nm angeregt und stellte sich unter einem Exzitationsmaximum von $\lambda = 580$ nm rötlich fluoreszierend dar. Sowohl für diese Färbung, als auch für das später durchgeführte Messprotokoll wurde eine Normaltyrode ohne antioxidative Substanzen verwendet. Für die Färbung wurde zunächst 1 ml der zuvor hergestellten Zellsuspension aus dem Inkubationsschrank entnommen und in einem Eppendorfgefäß 5 Minuten lang sedimentieren gelassen. Das Pellet wurde mit NT wieder auf 1 ml aufgefüllt. Dann begann die eigentliche Färbung indem 1 μ l der zuvor angesetzten MitoSOX -Lösung (20 μ l Pluronic auf 50 μ g MitoSOX) zur neuen Zellsuspension hinzugegeben und diese für genau 27 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert wurde. Abschließend wurde die Suspension für 3 Minuten wieder sedimentiert gelassen, der Überstand verworfen und das Pellet mit Hilfe von NT auf 1 ml aufgefüllt.

Auch im Rahmen der MitoSOX-Messungen wurde eine sich an das Messprotokoll anschließende Kalibrierung durchgeführt. Zentraler Bestandteile dieser Kalibrierung war das an der Atmungskette direkt wirkende Antimycin A, das durch Bindung an der Cytochrom c-Reduktase des Komplex III den Transfer von Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom c des Komplex IV verhindert. Unter physiologischen Bedingungen werden Elektronen vom Komplex III der Atmungskette über den intermembranösen Spalt auf das Cytochrom c und damit den Komplex IV transferiert. Dieser Komplex überträgt die aufgenommenen

Elektronen auf Sauerstoff, welcher durch die Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) zum Endprodukt Wasser und Wasserstoff reduziert wird (Kohlhaas and Maack, 2011).

In der Folge bleiben die Atmungskettenbestandteile vor dem Angriffspunkt von Antimycin A im Komplex III reduziert, während alle nachgeschalteten Komponenten durch den Elektronenverlust oxidiert werden. Sowohl der Sauerstoffverbrauch am Komplex I, als auch die ATP-Synthese im Komplex V werden dadurch unterdrückt (Turrens et al., 1985); (Turrens, 2003). Bei gleichzeitiger Anwesenheit der Farbstoffe MitoSOX und Antimycin A kommt es durch die massive Produktion von $\cdot\text{O}_2^-$ zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals, wodurch ein kalibrierendes Positivsignal generiert wurde (Mukhopadhyay et al., 2007). Das hierzu in unseren Experimenten verwendete Antimycin A wurde mit einer Konzentration von 50 mM zuvor in Ethanol gelöst.

Das zunächst durch die Mn-SOD aus $\cdot\text{O}_2^-$ entstandene H_2O_2 wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DCF gemessen. Dieses Messprotokoll wurde zusätzlich zu den MitoSOX-Aufzeichnungen gewählt, da die Mn-SOD die entstandenen Superoxide zum einen NADPH-unabhängig dismutiert, zum anderen unmittelbar in H_2O_2 umwandelt. Dementsprechend war es nötig die H_2O_2 -Produktion als gesonderten Parameter zu bestimmen. DCF verfügt über eine definierte Anregungswellenlänge von $\lambda = 480$ bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 520$ nm.

Zur Beladung der Myozyten mit dem Farbstoff wurden zunächst 50 μg DCF in 86,5 μl DMSO gelöst. Gleichzeitig wurde 1 ml der Zellsuspension aus dem Wärmeschrank entnommen und für 5 min absetzen gelassen. 0,75 bis 4 μl der hergestellten Färbelösung und 1 ml NT wurden zu dem gebildeten Pellet gegeben. Die damit hergestellte Lösung wurde bei 37 °C für zunächst 15 Minuten im liegenden Eppendorfgefäß inkubiert und anschließend 5 Minuten aufgestellt. Das durch Sedimentierung gebildete Pellet wurde im Rahmen des Mediumwechsels mit neuer NT abschließend aufgefüllt.

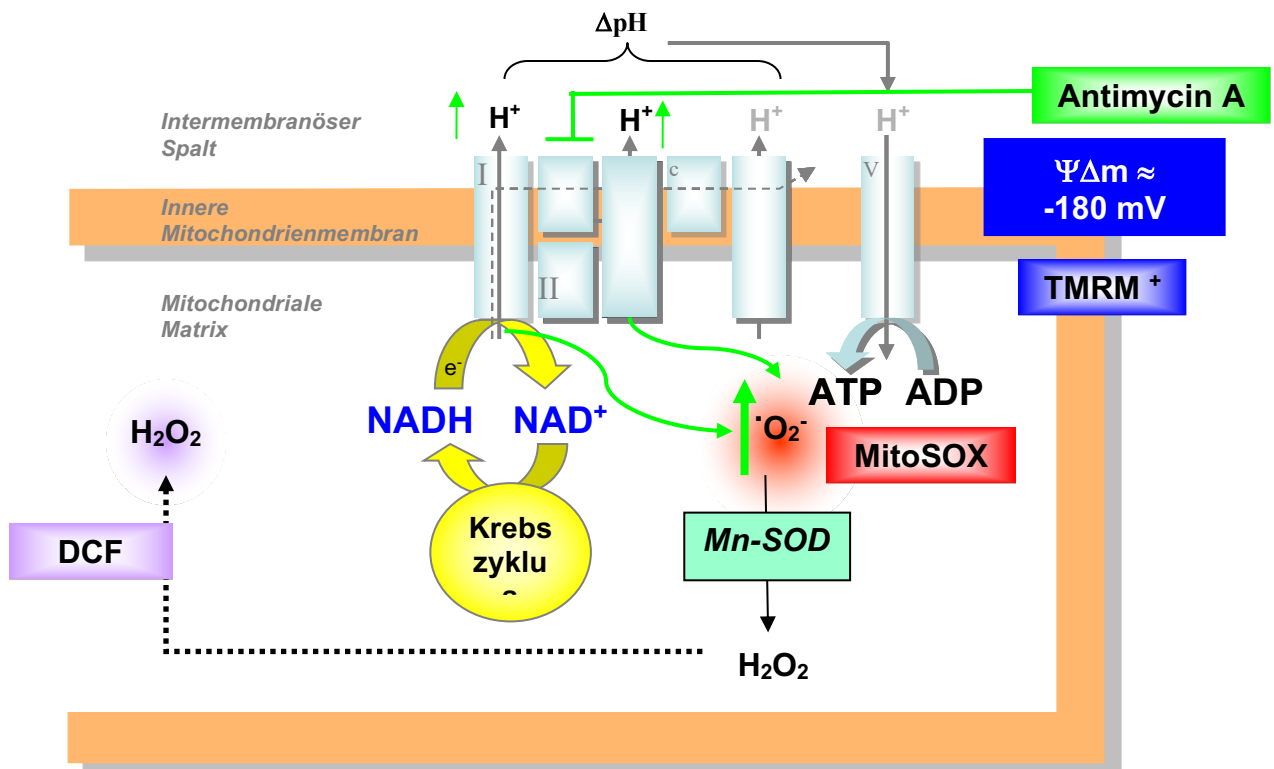


Abbildung 25: Fluorezentrischer Messort von TMRM⁺, MitoSOX, DCF und Wirkung von Antimycin A in Mitochondrien. Antimycin A greift im Zyklus vom Komplex III an (Modifiziert nach Kohlhaas and Maack, 2010).

Auch bei den Aufzeichnungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Indo-1 wurden vor Beginn des Messprotokolls die Myozyten mit dem jeweiligen Farbstoff beladen. Hierzu wurde zunächst wieder in eine unmittelbar aus dem Wärmeschrank entnommene 1 ml Zellsuspension 1 μ l Indo-1 hinzugegeben. Der Farbstoff wurde zuvor in einer Konzentration von 4,95 μ M in DMSO gelöst. In der darauffolgenden 15-minütigen Inkubation der Lösung wurden die Zellen mit dem Farbstoff beladen und anschließend für 5 Minuten sedimentieren gelassen. Nach Verwerfen des Überstands wurde das verbleibende Pellet wieder mit NT auf 1ml vermengt und dem Messprotokoll zugeführt.

Um eine Aussage über mögliche Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials zu treffen nutzten wir den Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff TMRM⁺, welcher sowohl die zelluläre, als auch die mitochondriale Membran passieren kann ohne dabei zytotoxisch zu wirken. TMRM⁺ ist ein positiv geladener Farbstoff; diese Eigenschaft erlaubt es ihm, sich in den negativ geladenen Mitochondrien anzureichern. Die Beladung der Myozyten bestand

zunächst aus dem Hinzugeben von 0,25 µl TMRM⁺ in einer Konzentration von 0,025 µM zu einer 1 ml Myozytenlösung. Anschließend wurde durch 5-minütiges Sedimentieren ein Pellett gebildet, welches wiederum mit 1 ml NT aufgefüllt und der Messkammer zugeführt wurde.

Analog zum Farbstoff Indo-1 wurde auch beim Fluoreszenzfarbstoff SBFI eine anhängende Acetomethylestergruppe genutzt, um das Substrat über die Zellwand nach intrazellulär zu transportieren. Durch zyotosolische Esterasen wurde der Farbstoff in der Folge intrazellulär in seine freie, aktive Fluoreszenzform konvertiert. SBFI, AM (Natrium bindendes Benzofuran-Isophthalat) ist damit ein sensibler Parameter für intrazellulär frei vorliegendes Na⁺. Bei einer konstant maximalen Emission von 505 nm liegen zwei Peaks der Anregungswellenlängen bei 340 nm und 370 nm vor. Im Falle einer erhöhten intrazellulären Na⁺-Konzentration wird das Verhältnis beider Maxima in Richtung von 340 nm verschoben (Minta and Tsien, 1989).

Zur Färbung der Myozyten wurde anfangs unter Verwendung von 50 µg SBFI, das zuvor in 4,4 µl DMSO und 5% Pluronic gelöst worden war, eine Stockkonzentration von 10 mM angesetzt. 1 µl dieser färbenden Lösung wurde folglich zu 1 ml gewärmte Zellsuspension hinzugegeben. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und Lichtausschluss schloss sich eine Sedimentation der Zellsuspension von 5 Minuten an. Der Überstand wurde verworfen und die am Boden des Eppendorfgefäßes verbliebenen Myozyten mit 1 ml NT vermengt. Zur Abspaltung der Estergruppen erfolgte eine 30 min Vorinkubation.

3.1.2 Auswertung der Messungen an isolierten Myozyten

Die aufgezeichneten Daten der durchgeführten Messprotokolle wurde zunächst im Programm IonWizard gespeichert. In der Folge wurden diese Rohdaten in Windows Excel zwischen gespeichert und geordnet. Die endgültige Auswertung der Daten und das Erstellen von Statistiken erfolgte abschließend mit Hilfe des Graphikprogramms der Firma GraphPad Software Inc. (GraphPad Prism 5.01).

Bei den Aufzeichnungen von NAD(P)H, FAD, DCF, Mitosox und TMRM⁺ wurden alle vier Sekunden ein Datenpunkt aus 150 ms gemittelt.

Bei der Berechnung von Zellverkürzung, als auch bei den Indo-1 Messungen wurden hingegen lediglich einzelne Messzeitpunkte ermittelt. Hierzu wählten wir zu den jeweils ausgewählten, definierten Messzeitpunkten 4-5 dargestellte Amplituden aus und mittelten deren durchschnittliche Kinetik. Diese wurden als zusammengefasste Grafik errechnet. Die Sarcomerlänge wurde mit 250 Hz gesampelt, die Messungen mit Indo-1 mit 1 kHz.

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ definiert. Diese Signifikanz errechnete sich mit Hilfe einer two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest bzw. einem gepaarten oder ungepaarten t-Test. In den Abbildungen wie folgt dargestellt: #= $p < 0.0005$ "2wayANOVA". *= $p < 0.01$; ***= $p < 0.0001$ "Bonferroni posttests".

3.2 Messung an isolierten Mitochondrien

3.2.1 Mitochondrienisolation

Bevor die Herzen zur Isolation der Mitochondrien aus den WT und Mybpc3 Knock-In Mäusen operativ entnommen wurden, setzten wir zunächst in der Folge benötigten Lösungen an.

Die direkt nach dem Entfernen der Herzen genutzte Isolationslösung (IS) setzte sich aus 225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 2 mM HEPES und 1 mM EGTA zusammen. Anschließend wurde die Lösung mit TrisBase oder TrisHCl auf einen pH von 7,4 eingestellt. Analog dazu stellten wir ebenfalls die Mitochondrien Suspension Lösung (MSS) her, hier allerdings ohne EGTA. Die benötigte BSA/Proteinase-Lösung setzte sich zum einem aus 90 % BSA (4 mg/ml) und 10 % der Proteinase (1,6mg/ml) zusammen. Beide Substanzen wurden in IS gelöst. Zur Mitochondrienisolation eines Herzens setzten wir dabei vorab 1 ml der BSA/Proteinase-Lösung an (900 μ l BSA + 100 μ l Proteinase).

Zur Isolation der Mitochondrien der WT und Mybpc3 Knock-In Mäuse wählten wir die etablierte Methode nach Mela und Seitz (Mela and Seitz, 1979). WT- und Mybpc3-Mäuse

wurden mit 0,3 ml Rompum/ Ketavet (Xylazin/Ketamin, 1:2, unverdünnt, Bayer/Pfizer. 1 ml Xylazin-Injektionslösung enthält 20 mg Xylazin. 1 ml Ketavet-Injektionslösung enthält 57,67 mg Ketaminhydrochlorid) s.c narkotisiert. Analog zur Myozytenisolation wurde zunächst die Auslösbarkeit des Zwischenzehenreflexes getestet. Sobald dieser erloschen war, wurde das Herz frei präpariert, entnommen und in die zuvor angesetzte Isolationslösung (IS) überführt. Innerhalb der IS wurde das Herz geschwenkt und das restliche Blut entfernt. Von der Herzentnahme an wurden alle nachfolgenden Schritte durchgehend auf Eis durchgeführt. Im Rahmen des Präparierens wurden die Ventrikel abgetrennt und in einem 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäß unter Zugabe von 500 µl BSA (4mg/ml) / Proteinase-Lösung (0,16 mg/ml) zerkleinert; anschließend wurde der Gefäßinhalt 7 Minuten lang maschinell homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden zusätzlich 500 µl BSA / Proteinase-Lösung zum Homogenat hinzugegeben und weitere 7 Minuten im Homogenisator homogenisiert.

Die Lösung wurde bei 400 g bei 4 °C für 5 Minuten daraufhin zentrifugiert. Das hierbei durch Absetzen entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand in einem frischen 2 ml Reaktionsgefäß erneut der Zentrifuge zugeführt. Während der anschließend erneuten Zentrifugation (7700g, 10 min) wurden Zytosol und Mitochondrien voneinander separiert. Der dadurch gewonnene Überstand stellte die zytosolische Fraktion dar, während das gebildete Pellet die mitochondriale Fraktion war. Dieses Pellet wurde zunächst mit Hilfe von 400 µl IS resuspendiert und die gewonnene Suspension mit 1 ml IS weiter aufgefüllt. Diese Lösung wurde erneut zentrifugiert (7700g, 5 Minuten), abermals gewaschen und das entstandene Pellet resuspendiert und aufgefüllt. Dieser Schritt wurde allerdings diesmal mit zunächst 400 µl, beziehungsweise 1 ml Mitochondriensuspensionslösung (MSS) an Stelle der IS durchgeführt. Anschließend folgte dieser Schritt inklusive der Zentrifugation (7700g, 5 Minuten), dem Waschen und Auffüllen des Pellet mit Hilfe von MSS (400 µl und 1 ml) wiederholt. Das gebildete Pellet wurde abschließend in 100 µl MSS resuspendiert.

Die damit einhergehende Proteinbestimmung wurde nach Lowry et al mittels Bio-Rad Dc Protein Assay durchgeführt (Lowry et al., 1951).

Verwendete Materialien zur Mitochondrienisolation

Maus-Herz	
Eis	
Homogenisator für 15 ml	
4 Scheren (groß/klein; grob/fein)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzetten	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
1 x 2 ml Reaktionsgefäß zum Zerschneiden	Sarstedt, Nümbrecht
3 x 2 ml Reaktionsgefäß zum Zentrifugieren	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge (Heraeus Fresco 21 Centrifuge)	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe

Tabelle 8: Verwendete Materialien zur Isolation der Mitochondrien aus den Herzen von WT und Mybpc3 Mäusen.

3.2.2 Polarographische Atmungsmessungen an der Clark-Elektrode

Zur polarographischen Bestimmung der mitochondrialen Atmung der isolierten Herzmitochondrien (Clark et al, 1953) wurde von uns die Clark-Elektrode verwendet. Die im Rahmen der Experimente angelegte Spannung (0,4 - 0,8 Volt) führt an der Kathode zu einer Reduktion des Sauerstoffs und an der Anode zu einer Oxidation von Silbermolekülen, wie in Abbildung 26 exemplarisch dargestellt.

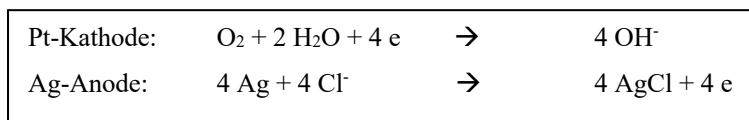


Abbildung 26: Reaktionsgleichung an der Platinkathode und der Silberanode (Renger and Hanssum, 2009). Der durch die an der Anode entstehenden Elektronen gebildete elektrische Strom wird per Nanoampèremeter gemessen.

In dem Experimentaufbau werden die Silberanode und die Platinkathode konstant durch eine 1 M KCl-Lösung befeuchtet und gelagert. Der an der Kathode entstandene Sauerstoff diffundiert entlang eines Konzentrationsgradienten durch eine semipermeable Membran in Richtung der Kathode. Die durch die Oxidation der Silberionen entstehenden, freien Elektronen lassen einen elektrischen Strom entstehen, welcher proportional zur Anzahl der reduzierten Sauerstoffmoleküle ist. Aufgezeichnet wird dieser und dessen Stärke mit Hilfe eines Nanoampèremeters (Bugger et al., 2006). Der aufgezeichnete Strom wird durch das Computersystem (Oxygraph Plus) quantitativ in die innerhalb der Reaktionskammer befindlichen Sauerstoffkonzentration umgerechnet und damit der Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien detektiert.

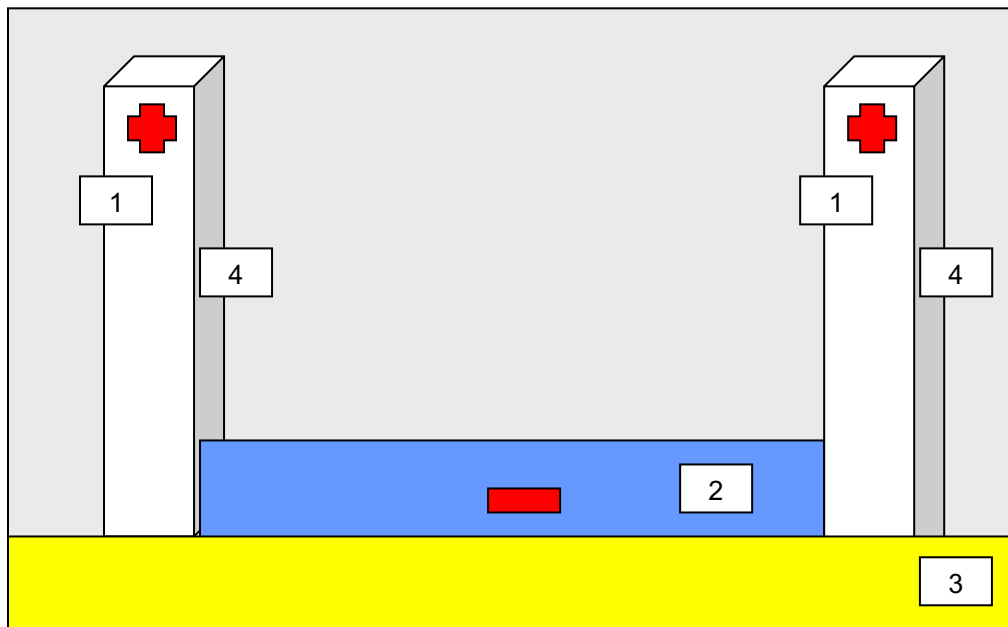


Abbildung 27: Schematischer Aufbau der Clark-Elektrode (modifiziert nach Renger and Hanssum, 2009).

1: Elektrolyt KCl. 2: Platinkathode. 3: Semipermeable Membran. 4: Silberanode. Über die semipermeable Membran wandern die zuvor an der Silberanode entstandenen Elektronen über die semipermeable Membran zur Platinkathode.

Die Messkammer wurde mit einem Wasserbad auf 30 °C erwärmt und diese in der Folge 2- bis 3-mal mit Wasser gespült und per Natriumdithionit, das den enthaltenen Sauerstoff zuvor absorbiert, kalibriert. Der durch einen Magnetrührer konstant durchmischte Kammerinhalt betrug zu jeder Messung insgesamt 2 ml. Er setzte sich zusammen aus 400 µg Mitochondrien und Atmungspuffer.

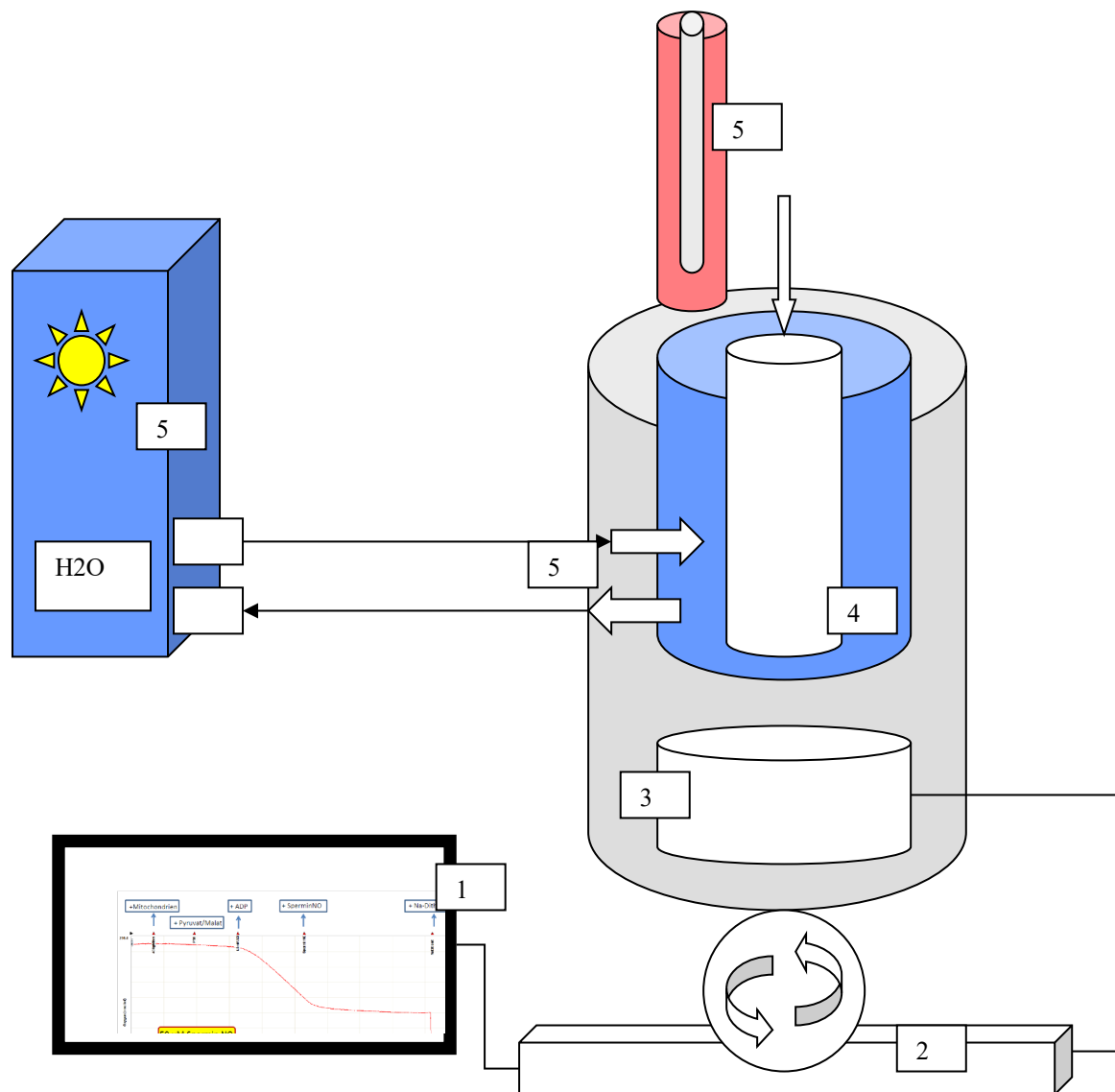


Abbildung 28: Schematischer Versuchsaufbau der Atmungsmessung isolierter Mitochondrien (nach Liebig et al., 2004). 1 Computer. 2 Interface mit Magnetrührer. 3 Clark-Elektrode. 4 Messkammer mit Wassermantel. 5 Verschlusskappe mit Injektionskanal. 6 Aufgewärmtes Wasserbad. 7 Zu- und Abfluss zum Wasserbad.

Unsere Messungen der mitochondrialen Zustände rührten auf eine entsprechende Erstarbeit von Chance und Williams 1955 zurück (Chance and Williams, 1955).

Der erste Schritt der experimentellen Atmungsmessungen bestand aus dem Hinzugeben des Atmungspuffers (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) in die Messkammer. Sobald sich das dadurch gebildete Signal als stabil zeigte, wurden die Mitochondrien hinzugefügt und erneut

eine Stabilisierung des Sauerstoffverbrauchs abgewartet. Dieser Schritt führte zum sogenannten State 1, in dem ausschließlich die endogenen Substrate der Mitochondrien verbraucht wurden und der Sauerstoffgehalt über die Zeit abfiel. Die per Hamilton-Spritze anschließende Zugabe der Substrate Pyruvat und Malat (jeweils 20 µl, 500 mmol/L) initiierte als eigentliche mitochondriale Atmung den State 2, das heißt die maximale Produktion von NADH. Damit startete die eigentliche Messdatenaufzeichnung. Nach 3 Minuten wurden im zweiminütigen Abstand jeweils 10 µl 200 mM ADP in den 4 unterschiedlichen Konzentrationen 30 µM, 100 µM, 300 µM und 1 mM schrittweise hinzugegeben.

Substanz	Konzentration
KCL	137 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2,5 mM
HEPES	20 mM
EGTA	0,5 mM

Tabelle 9: Zusammensetzung des verwendeten Atmungspuffers für die Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien. Mit Hilfe von 1 M KOH wurde der pH-Wert nachfolgend auf 7,2 titriert. Bis auf MgCl₂ (Firma Merck) wurden alle anderen Substanzen von der Firma Sigma-Aldrich hergestellt.

Da damit die ATP-Produktion an der F₁F₀-ATPase am Ende der Atmungskette durch die letztendlich maximale ADP Konzentration hochgradig stimuliert wurde, führte dieser Schritt zu einer maximalen, mitochondrialen Atmung und dem so bezeichneten State 3. In diesem Zustand wird die Elektronentransportkette und die ATP-Produktion durch die F₁F₀-ATPase maximal stimuliert. Unter physiologischen Bedingungen nimmt der Sauerstoffverbrauch im State 4 vergleichsweise zur State 2 Atmung ab.

Der abschließende State 4 repräsentierte die mitochondriale Atmung unter aufgebrauchtem ADP. Hierzu verwendeten wir 10 µl eines Hemmstoffs der der F₁F₀-ATPase, 1,3 µM Oligomycin. Die dadurch entstehende Respiration in ADP-Abwesenheit stellt eine unphysiologische Situation dar. Über die sich noch aufrechterhaltende „Leak Atmung“, sprich Restatmung lassen sich im Nachhinein Aussagen zur Funktionalität der inneren

Mitochondrienmembran treffen. Im Rahmen von mitochondrialen Schädigungen kommt es über diese Membran zu einem Protonenfluss, der die „Leak Atmung“ letztlich entstehen lässt.

Ein weiterer Bestandteil unserer Messungen wurde darauf ausgerichtet zu untersuchen, ab welcher NO-Konzentration eine relevante Hemmung der Atmungskette stattfinden würde. Hierzu nutzten wir verschiedene, zuvor angesetzte SperminNO-Konzentrationen (1 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 50 μM), die wir am Ende eines jeden Protokolls schrittweise hinzugaben (Abbildung 29).

Der Abfall der Sauerstoffkonzentration über 1 Minute wurde bestimmt und ins Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge gesetzt. Die Positivkontrolle wurde durch eine Spatelspitze Natrium-Dithionit garantiert, welches einen Verbrauch des restlichen Sauerstoffs zur Folge hatte.

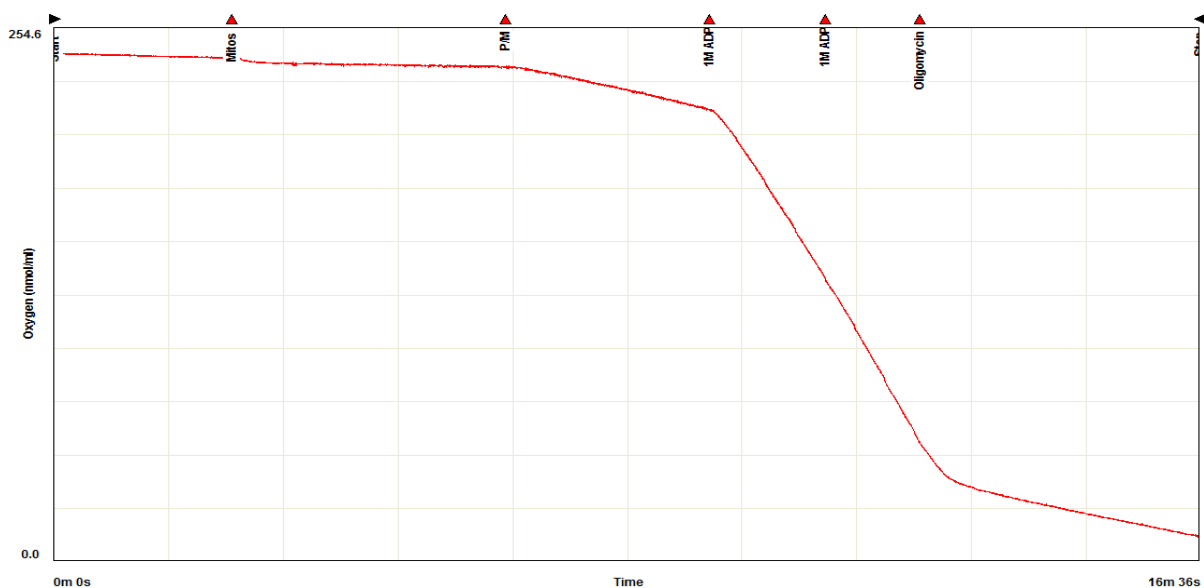


Abbildung 29: Exemplarisch dargestellte Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien mit finaler Oligomycin Konzentration 1,3 μM . Das Zugeben von ADP lässt die mitochondriale Atmung deutlich beschleunigen, was durch den steileren Kurvenverlauf repräsentiert wird. Die Zugabe von Oligomycin führt zu einer Hemmung der mitochondrialen Atmung, wodurch die Kurvesteigung deutlich abnimmt ab.

3.2.4 Messung von mitochondrialem Superoxid

Die mitochondriale Superoxidproduktion wurde mit Hilfe der Electron paramagnetic resonance (EPR) anhand eines Spektrometers (ESP300e) durchgeführt. Nach einer präexperimentellen Kalibrierung des Spektrometers mit dem Referenzwert des SOD-Mimetikums Tempol (100 μM), das $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 und O_2 umwandelt begannen unsere Messungen mit der Einstellung der parametrischen Messkonstanten. Hierzu wurden für den Parameter Time 20,48 s und für Time constant 10,24 s festgelegt. Während dieser konstant eingegebenen Messzeit von 20,48 ms wurde die Superoxidproduktion mit einer Amplitudenmodulation von 0.1 mT und einer Anregungsenergie von 20 mW insgesamt achtmal pro Experiment gemessen. Die Phase wurde dabei um die Phasendifferenz 90° verschoben. Diese Abweichung ist insofern relevant, als dass die entstehende Signalintensität proportional zum Kosinus der Phasendifferenz zwischen dem Referenzsignal und dem eingehenden modulierten ESR-Signal ist. Bei einer Phasendifferenz von 90° wird diese somit über den $\cos(90^\circ)$ gleich 0. Dadurch lässt sich das Signal durch das komplette Entfernen der Phasendifferenz leichter und genauer bestimmen.

Zur Detektion der Superoxidproduktion wurde als Spin-Trap-Molekül CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine) in einer Konzentration von 300 μM genutzt. CMH wurde zuvor mit DF-DETC-Wasser, das bereits vorher mit Stickstoff (N_2) für 20 Minuten entgast worden war, verdünnt und zudem jeden Messtag neu angesetzt. Als zyklisches Hydroxylamin wird CMH durch $\cdot\text{O}_2^-$ schnell oxidiert, wodurch folglich ein relativ stabiles CM-Radikal mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden entsteht. Neben seiner Eigenschaft als guter Detektor für intrazelluläres $\cdot\text{O}_2^-$ aufgrund seiner Zellpermeabilität *per se* verfügt CMH gegenüber den gebräuchlichen Nitronen den weiteren Vorteil, dass es sehr zügig mit $\cdot\text{O}_2^-$ reagiert. Dadurch kann es mit anderen zellulären Antioxidantien konkurrieren.

Im Rahmen unserer Messungen wurde CMH präexperimentell in einem kurz gehaltenen Zeitintervall von wenigen Sekunden in eine 50 μl Quarz-Kapillare gegeben und mit Silikonmasse verschlossen. Diese Glaskapillare wurde wiederum zügig in den Resonator, einer dafür vorgesehenen Fassung dem Spektrometer zugeführt. Die darin enthaltenen 12 μg Mitochondrien wurden zudem vor dem Start der Messungen für 3 Minuten bei 37°C mit 30 μl

Atmungspuffer inkubiert. Abgesehen von den State-1-Messungen befanden sich die Mitochondrien bereits während der Vorinkubation in der P/M-Lösung. Alle anderen Reagenzien wurden konstant auf Eis gelagert. Die ADP-Lösungen wurde in der finalen Konzentration von 1 mM angesetzt. Während der Experimente wurden die detektierten Spektren als Messergebnisse mit Hilfe der Software „LilaX“ aufgezeichnet. Die Lösungen wurden jeweils achtmal zu je einer Minute untersucht; die Experimentdauer betrug damit jedes Mal 8 Minuten. Die acht einzelnen Messresultate wurden akkumuliert, wodurch sich die Signal to Noise Ratio (SNR) verbesserte. Bei der nachfolgenden Auswertung, die mit Hilfe des Softwareprogramms „Medeia“ vorgenommen wurde, waren die Peak-to-Peak-Intensitäten zum einem und die Breite der ESR-Signale des CM-Radikale in den Messverläufen zum anderen von Relevanz. Dabei wurden diese Rohdaten in ein quantitatives Verhältnis zur Tempol-Referenz (100 µM) ins Verhältnis gesetzt und kalkuliert.

3.2.5 Fluorometrische Wasserstoffperoxidmessung mittels Amplex® UltraRed-Assay

Zur Messung der mitochondrialen H₂O₂-Produktion an isolierten Mitochondrien nutzten wir das spezifischen Reagenz Amplex® UltraRed (AUR). AUR, das durch die Horse Raddish Peroxidase (HRP) katalysiert wird, reagiert sehr sensitiv mit H₂O₂ zu Wasser und Resorufin bei einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Damit lässt sich anhand der registrierten Menge von Resorufin eine quantitative Schlussfolgerung über die H₂O₂-Produktion stellen. Durch seine Eigenschaft als Fluorophor konnte das gebildete Resorufin als starkes Fluoreszenzsignal gemessen werden.

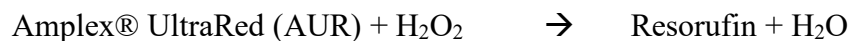


Abbildung 30: Reaktionsgleichung der fluorometrischen Wasserstoffperoxidmessungen an isolierten Mitochondrien. Durch das gebildete Resorufin lässt sich die Bildung von H₂O₂-Produktion quantifizieren. Anregungs- und Emissionsmaxima von Resorufin liegen bei 568/581 nm.

AUR wurde in DMSO gelöst. HRP und SOD wurden in Aqua bidest gelöst; AP, Pyruvat/Malat, Antimycin A und FCCP jeweils in Atmungspuffer. Zu der in DMSO gelösten AUR-

Lösung wurden bei allen Messungen 50 μM AUR, 0,5 U/ml HRP und 100 U/ml SOD als Master-Mix hinzugegeben (MM). Zudem wurde außer im Falle der State-1-Bedingung Pyruvat/ Malat dem Master-Mix in einer finalen Konzentration von 5mM zugefügt. Folgende Tabelle veranschaulicht das Pipettierschema:

	State 1	State 2	State 3	DNP	AntiA
buffer	20	20	10	0	0
Mitos	10	10	10	10	10
MM	170	170	170	170	170
ADP (20 mM)	0	0	10	10	0
DNP (5mM)	0	0	0	10	0
AntiA (300 μM)	0	0	0	0	10

Tabelle 10: Zusammensetzung der AUR-Lösungen unter den unterschiedlichen Messbedingungen der mitochondrialen Wasserstoffperoxidmessungen mittels Amplex® UltraRed-Assay. Jedes Well hatte dabei ein konstantes Gesamtvolumen von 200 μl .

Die Messungen fanden unter Verwendung von transparenten 96-Well-Platten statt. Bevor die eigentlichen Messungen starteten wurde die Mikrotiterplatte in das Gerät eingelegt und 15 Sekunden lang geschüttelt. Bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 37 °C wurden die Messungen insgesamt 2 Stunden bei einem Messintervall von 2 Minuten vollzogen. Alle Bedingungen wurden darunter dreifach bestimmt. Da bekannterweise das optimale Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei 535_{Ex}/590_{Em} nm lag, wurden die Messungen außerhalb dieser angegebenen Anregungs- und Emissionsmaxima erhoben. Zur Quantifizierung der eigentlichen H₂O₂-Produktion diente eine standardisierte Verlaufskurve.

Der Hintergrund wurde ebenso für jede Versuchsbedingung bestimmt und war vergleichbar. Die Auswertung erfolgte in Excel, indem durch Umrechnung der RFU die H₂O₂-Menge quantifiziert werden konnte. Hier wurde die Kumulationsrate bei 26 min verwendet, da anhand derer bei jedem Zyklus die neu produzierte H₂O₂-Menge detektiert wurde, des Weiteren die H₂O₂-Produktion pro Minute und die Produktion pro μg mitochondrialem Protein.

3.2.6 Auswertung der Messungen an isolierten Mitochondrien

Mit Hilfe des Computerprogramms Oxygraph Plus, Version 1.02 erfolgte sowohl die Messaufzeichnung, als auch die Auswertung der Experimente an der mitochondrialen Atmung. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 6.01.

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ definiert. Diese Signifikanz errechnete sich mit Hilfe einer two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest bzw. einem gepaarten oder ungepaarten t-Test.

Zu den einzeln gemessenen Werten wurden zudem die arithmetischen Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen des Mittelwertes ($SEM = \text{Varianz} / n$; $n = \text{Anzahl der Experimente}$) errechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsmessungen der Mybpc3-KI & Wildtyp Myozyten

4.1.1 Mortalitätsrate

Die Kardiomyozyten von WT und Mybpc3-KI Mäusen wurden einem physiologischen Stressprotokoll ausgesetzt, bei dem sie 3 min lang einer erhöhten Stimulationsfrequenz von 5 Hz nach β -adrenerger Stimulation mit dem β -adrenergen Rezeptor Agonisten Isoprenalin in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt wurden. Diese erste Serie diente der Findung einer idealen Stimulationsdauer und Isoprenalin Konzentration. Während die WT Myozyten allesamt das Protokoll auch bei maximaler Isoprenalin Konzentration überlebten, trat bei Mybpc3-KI Myozyten häufig ein verfrühter Zelltod auf, der sich durch eine Hyperkontraktur und Abrunden der Myozyten zeigte. Die Zeit bis zum Zelltod steigerte verkürzte sich steigender Isoprenalin Konzentration. Um ein Überleben möglichst vieler Zellen unter Isoprenalin und der Arbeitslasterhöhung für die weiteren Analysen zu gewährleisten, verwendeten wir eine Isoprenalin-Konzentration von 10 nM (Abbildung 31, graue Linie).

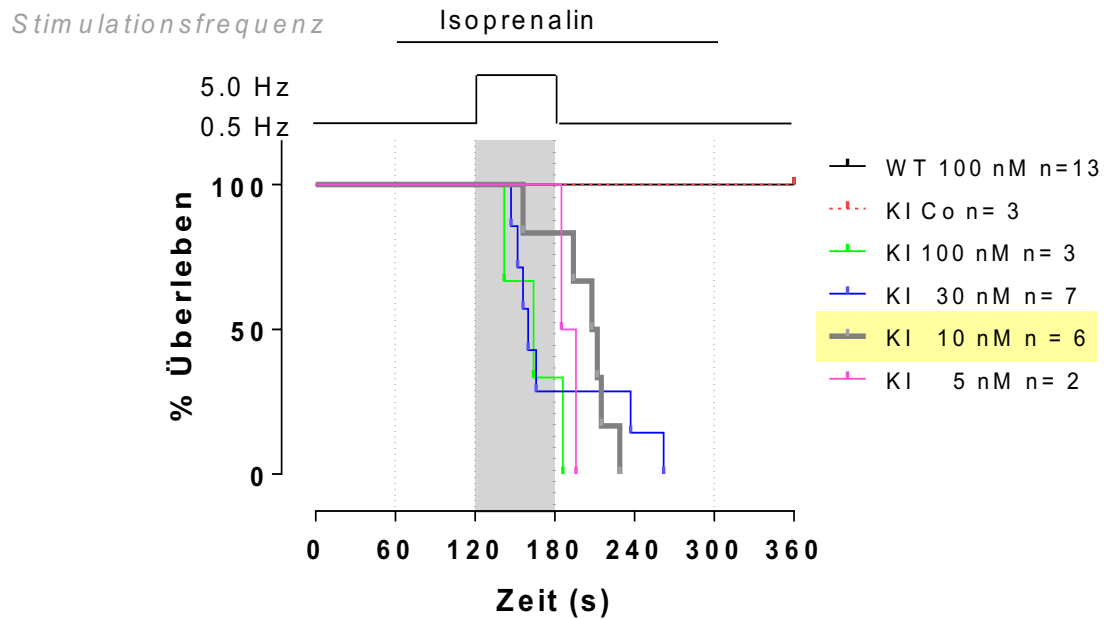


Abbildung 31: Sterblichkeitsraten der Myozyten von Wildtyp- (schwarz) und Mybpc3-Knock-In-Mäusen (blau) unter verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen. X-Achse = prozentualer Überlebensanteil der jeweiligen Zellen. n = Anzahl der untersuchten Myozyten zu den jeweiligen Isoprenalinkonzentrationen. Bei den Wildtypen-Myozyten wurde eine konstante Isoprenalinkonzentration (100 nM) genutzt, während bei den transgenen Mybpc3-Knock-In-Myozyten unterschiedliche Konzentrationen eingewaschen wurden. Zudem wurde ein Messversuch mit Knock-In-Myozyten ohne Isoprenalinzugabe durchgeführt (rot-gestrichelte Linie).

4.1.2 Zellverkürzungsmessungen

Zu Beginn unserer Experimente interessierten uns zunächst die Auswirkungen der Myozyten-spezifischen Mutation des Myosin-bindenden Protein C auf die Parameter der elektromechanischen Kopplung. Diese wurden analog zu den Fluoreszenzprotokollen zunächst bei einer Stimulationsfrequenz von 0.5 Hz und anschließend unter der erhöhten Arbeitslast bei 5 Hz in der Gegenwart von Isoprenalin ausgesetzt. Hierbei wurden die Myozyten der Wildtypen mit denen der Mybpc3-KI Mäuse verglichen.

Messprotokoll

0,5 Hz	0,5 Hz	5 Hz	0,5 Hz
NT	ISO	ISO	NT
60 s	bis Wirk- eintritt	60 s	60 s

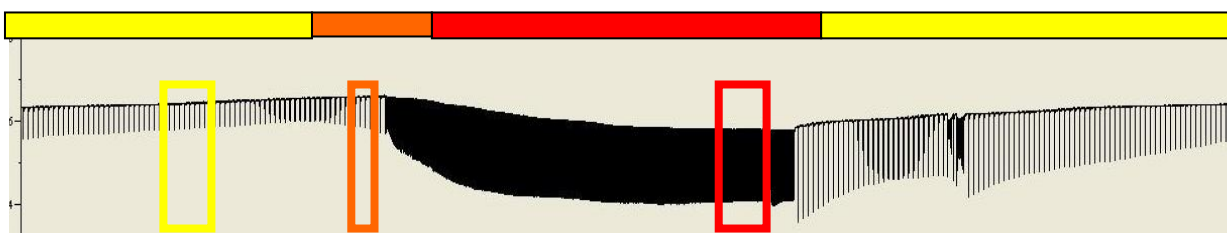


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der während der Protokolle gemessenen Werte der Zellverkürzung und deren Messzeitpunkte. Diese wurden allgemein gegen Ende jeder Protokollphase gesetzt, um ein möglichst stabiles Plateau der Kinetiken zu garantieren. Die Auswertungspunkte sind mittels der aufgeführten Rechtecke dargestellt: Gelb: 0,5 Hz vor Isoprenalingabe, NT. Orange: 0,5 Hz, Isoprenalinwirkung, drei Sekunden vor Beginn mit 5 Hz. Rot: Ende der Stimulationsphase mit 5 Hz, Isoprenalin.

Der in der exemplarischen Darstellung abgebildete gelbe Messrahmen zeigt den Messpunkt 1, der nach 60 s bei permanenter NT-Gabe unter einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz definiert wurde. Der orange Messzeitpunkt 2 repräsentiert hingegen den Zeitpunkt, an dem der Effekt von Isoprenalin (10 nM) sich zu entfalten begann. Der rote Messzeitpunkt veranschaulicht die nach 50 s detektierten Messwerte im Rahmen der simulierten, physiologischen Erhöhung der Arbeitslast (Feldstimulationserhöhung auf 5 Hz unter weiterhin β -adrenerger Stimulation). Insgesamt bestanden die Messungen der Zellverkürzungsparameter sowohl aus diastolischer als auch systolischer Sarkomerlänge, inklusive der fraktionellen Zellverkürzung und dem Zeitintervall bis zur maximalen Sarkomerverkürzung und der anschließenden 50- bzw. 90-prozentigen Sarkomerrelaxation. Verglichen wurden die beiden Versuchsgruppen von WT und Mybpc3 KI bezüglich Zellverkürzungsamplituden, die wir während der Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FAD parallel detektierten.

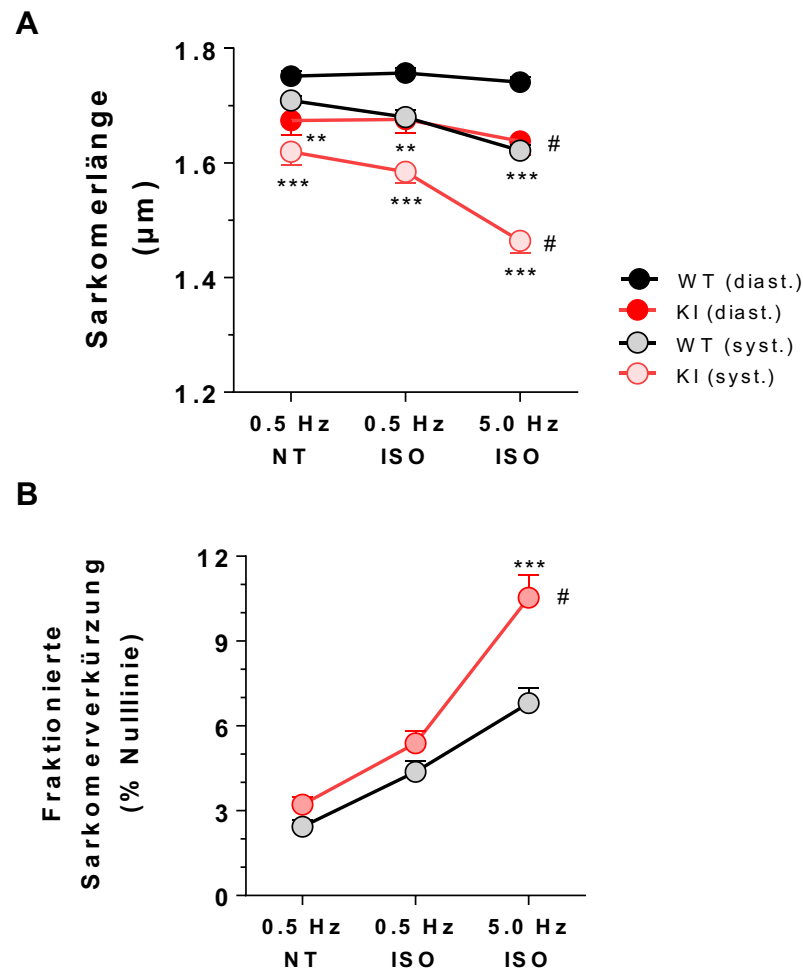


Abbildung 33: Kontraktilität mit diastolischer und systolischer Sarkomerlänge (A) und systolisch-fraktioneller Verkürzung in % vom Basalwert (B) der Myozyten von WT und Mybpc3 KI. Messzeitpunkte 0,5 Hz mit NT, 0,5 Hz mit Isoprenalin und 5 Hz mit Isoprenalin. Signifikanter Unterschied unter Hinzugabe von Isoprenalin und Steigerung Simulationsfrequenz auf 5 Hz. Die Daten wurden simultan zu den Messprotokollen von NAD(P)H und FAD ermittelt. n-Zahlen: WT (n=24) und Mybpc3 KI (n=20). Alle dargestellten Ergebnisse sind anhand der n-Zahlen als Mittelwerte + SEM errechnet. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben. #= $p < 0.0005$ "2wayANOVA". **= $p < 0.001$; ***= $p < 0.0001$ "Bonferroni posttests".

Die diastolischen und systolische Sarkomerlängen der Myozyten waren zu allen Zeitpunkten unterschiedlich zwischen den Gruppen (Abbildung 33, oben): Sowohl die diastolische als auch die systolische Sarkomerlänge präsentierten sich bereits bei 0.5 Hz in Mybpc3-KI Myozyten deutlich kürzer also in WT Myozyten, was sich bei 5 Hz Stimulation weiter aggravierte.

Dies wird durch die gemittelte Darstellung der Sarkomerlängen unter Kontraktion und 0,5 Hz oder 5 Hz weiter unterlegt (Abbildung 33 und 34).

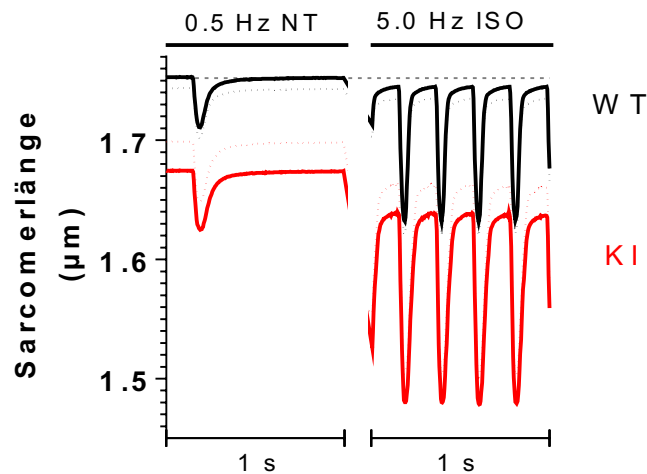


Abbildung 34: Mittelwerte der Sarkomerlängen von WT und Mybcp3-KI Myozyten unter Kontraktion von 0,5 Hz + NT und 5 Hz + Isoprenalin von WT. n-Zahlen als Myozytenzahlen von WT (n=24) und Mybcp3-KI (n=20).

Als Ableitung aus der Differenz von diastolischer und systolischer Sarkomerlänge präsentierte sich die fraktionelle Sarkomerverkürzung basal in beiden Genotypen vergleichbar, nahm jedoch unter Isoprenalin und 5 Hz bei den Mybcp3 KI Tieren stärker zu als in den Wildtyp Kontrollen (Abbildung 33). Zum Zeitpunkt der physiologischen Arbeitslast entstand auch hier ein signifikanter Unterschied ($p < 0.0005$ "2wayANOVA" und $p < 0.0001$ "Bonferroni posttests".)

Weiterhin untersuchten wir die Kinetiken der Myozyten mit Hilfe der Time to Peak, also der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion und der Relaxationszeit, die Zeit bis zur 50%igen (RT_{50}) als auch zur 90%igen Relaxation der Sarkomere (RT_{90}).

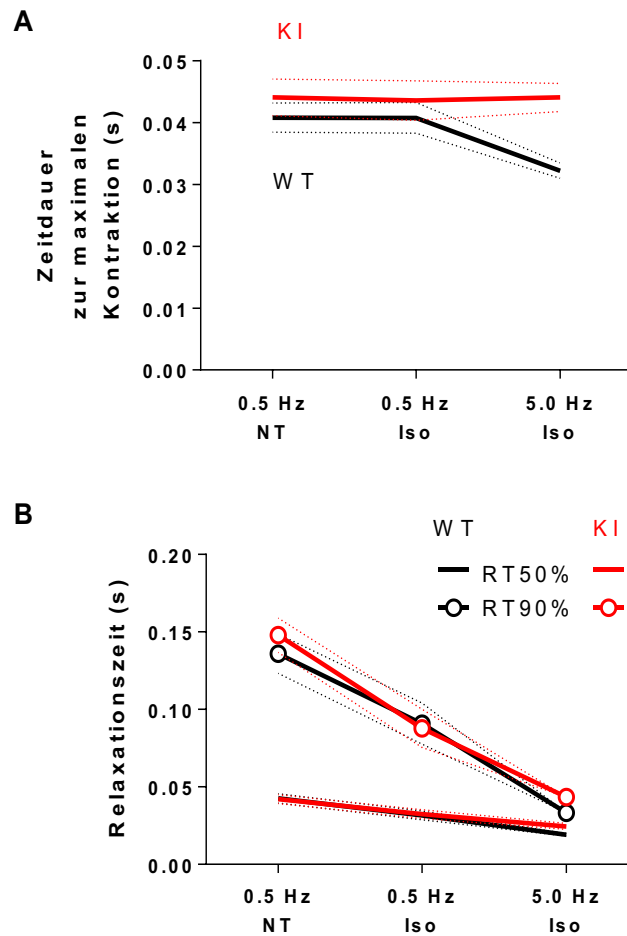


Abbildung 35: Zeitdauer bis zur maximalen Kontraktion (Time to peak in Sekunden, A) und Zeitspanne bis zur 50% und 90%-igen Relaxation vom Maximalwert der Verkürzungsamplitude (Relaxationszeit/Relaxationtime RT, B) von Myozyten der WT und Mybpc3-KI. Die Daten wurden simultan zu den Messprotokollen von NAD(P)H und FAD ermittelt. Keine signifikanten Unterschiede. Time to Peak zwischen beiden Versuchsgruppen mit $p=0.0514$ (2wayANOVA). Alle dargestellten Ergebnisse sind anhand der n-Zahlen als Mittelwerte + SEM errechnet. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben, WT (n=26) und Mybpc3-KI (n=21).

Bezüglich der Time to Peak entstanden während der Messprotokolle keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen. Auch die RT_{50} also auch die RT_{90} waren zwischen beiden Gruppen nicht signifikant verändert. Die Kinetik präsentierte sich damit zwischen beiden Myozytengruppen gleich.

Darüber hinaus konnten wir bereits früh in unseren Experimenten feststellen, dass vor allem die Myozyten der Mybpc3 KI, die später auch vermehrte ROS-Bildung zeigten, insgesamt zu

deutlich mehr Arrhythmien und genereller Hyperkontraktilität neigten (Flenner et al., 2016). Aufgrund dieser Beobachtungen limitierten wir im Zuge des entworfenen Stressprotokolls, wie oben beschrieben, die maximale Stimulationsfrequenz von 5 Hz auf ein Zeitintervall von einer Minute für Mybpc3 KI und Wildtypen. Zum Ende der Messanalyse hin reduzierten wir die Stimulationsfrequenz wieder auf die initiale basale Rate von 0,5 Hz.

4.1.3 Intrazelluläre Calciumkonzentrationen

Unter Zuhilfenahme des ratiometrischen Farbstoffs Indo-1 wurden die Konzentrationen des intrazellulären Calciums $[Ca^{2+}]_c$ der Myozyten aufgezeichnet. Diese Konzentrationen wurden analog der Zellverkürzung in der Diastole und in der Systole detektiert.

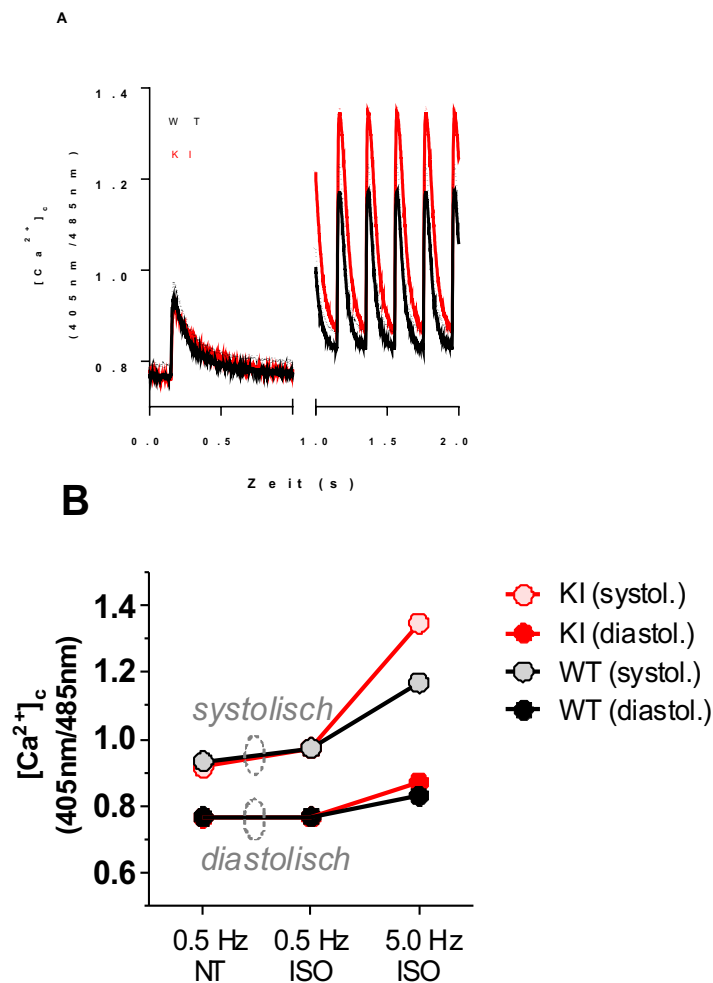


Abbildung 36: Zytosolische Calciumkonzentrationen der WT und Mybpc3-KI Myozyten als Mittelwerte der Amplituden (A) und in Systole und Diastole (B). Gemessen an der IonOptix Anlage. Höhere intrazelluläre Calciumkonzentrationen der transgenen Mybpc3-KI Tiere, sowohl diastolisch und systolisch. n-Zahlen der WT (=22) und Mybpc3-KI (=18) Myozyten. Keine signifikanten Unterschiede.

Beide Mausmodelle zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der zytosolischen Calcium Konzentration $[Ca^{2+}]_c$.

Parallel zu den Messungen an der IonOptix-Anlage wurden an einer Patch-Clamp Anlage zum einen die zytosolischen, zum anderen die mitochondrialen Calciumkonzentrationen gemessen. Die zeitliche Abfolge des Messprotokolls war hier zu den Messungen an der IonOptix-Anlage gleich. Diese Messungen wurden von Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg durchgeführt. Die Patch-Clamp basierten Calcium-Analysen zeigten hierbei, dass sowohl die zytosolische als auch mitochondriale Calcium Konzentration systolisch tendenziell eher höher in den Myozyten der WT gegenüber den KI Mäusen war. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die diastolischen Messwerte zeigten keine Unterschiede.

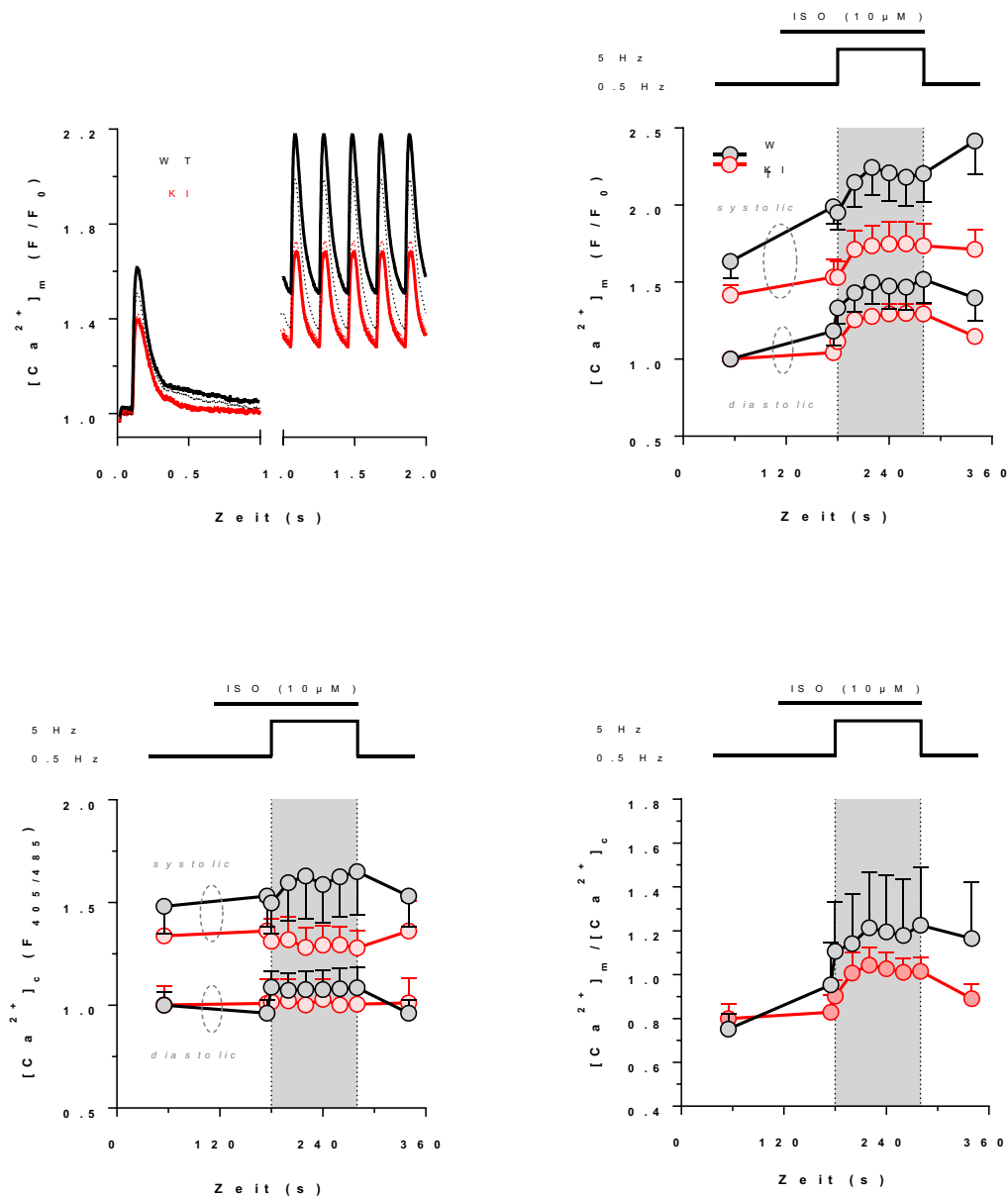


Abbildung 37: Patch-Clamp-Daten des mitochondrialen Ca^{2+} -Einstroms (oben-links), der mitochondrialen $[Ca^{2+}]_m$ und zytosolischen $[Ca^{2+}]_e$ Calciumkonzentrationen und dem Verhältnis $[Ca^{2+}]_m / [Ca^{2+}]_e$ der Myozyten von WT (n=14) und Mybpc3-KI (n=9). Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich mitochondrialer Ca^{2+} -Aufnahme zwischen beiden Versuchsgruppen. Auch die diastolischen Konzentrationen waren in beiden Gruppen gleich. Die daraus resultierende Ratio $[Ca^{2+}]_m / [Ca^{2+}]_e$ ebenfalls Messwerte ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Ergebnisse ermittelt und ausgewertet von Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, Innere Medizin III, Universitätsklinikum Homburg. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben.

Damit ergaben sich innerhalb der β -adrenergen Arbeitslasterhöhung keine signifikante Unterschiede bei den zytosolischen Calciumkonzentrationen und Calciumamplituden zwischen beiden Mausstämmen (Abbildung 37). Die diastolische Wiederausdehnung der Sarkomere zeigte keine Differenzen, während die 50- bzw. 80%ige Abnahme der $[Ca^{2+}]_c$ bei Mybpc3-KI gegenüber WT bei 0.5 Hz verlangsamt waren (Abbildung 38).

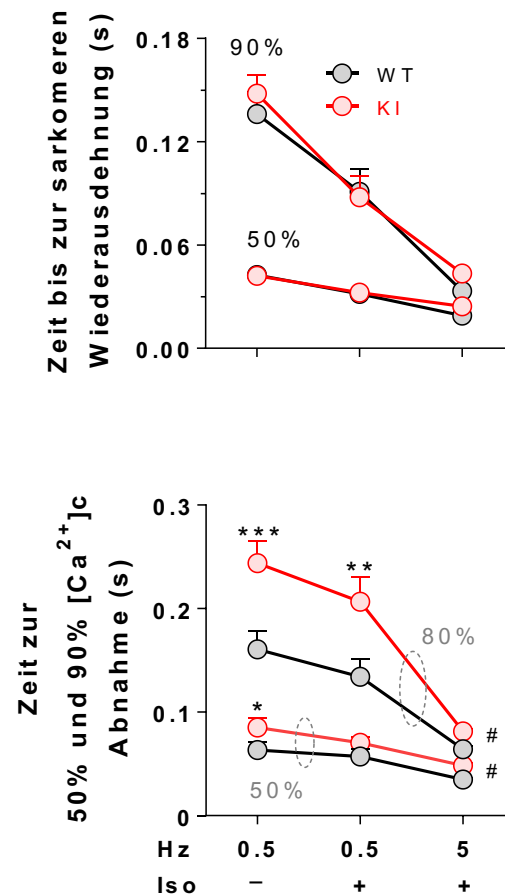


Abbildung 38: Zeit bis zur sarkomeren 50- bzw. 90%igen Wiederausdehnung der WT (n=26) und Mybpc3-KI (n=21) Myozyten als Mittelwerte (A) und Zeit bis zur 50- bzw. 80%igen Abnahme des zytosolischen $[Ca^{2+}]_c$ der WT (n=23) und Mybpc3-KI (n=18) (B). Gemessen an der IonOptix Anlage. Keine signifikanten Unterschiede bei der sarkomeren Wiederausdehnung.. Signifikante Unterschiede des 50%igen zytosolischen Calciumsaustroms bei 0,5 Hz mit NT und des des 80%igen zytosolischen Calciumsaustroms bei bei 0,5 Hz mit NT und bei 0,5 Hz mit Iso. #= $p < 0.0005$ "2wayANOVA". **= $p < 0.001$; ***= $p < 0.0001$ "Bonferroni posttests".

Die gemessenen mitochondrialen und zytosolischen Calciumkonzentrationen während der Diastole wurden im weiteren Verlauf der Auswertungen in ein definiertes Verhältnis zueinander gesetzt. Auch die dadurch erstellte Ratio $[Ca^{2+}]_m / [Ca^{2+}]_c$ präsentierte einen ähnlichen Verlauf der Messprotokolle zwischen beiden Versuchsgruppen. Die Ratio und damit die Effektivität der mitochondrialen Calcium Aufnahme waren dabei allerdings – wenn auch nicht signifikant – bei den Knock-In Mäusen leicht erniedrigt (Abbildung 37).

4.1.4 Ermittlung des sarkomeren Längenintegrals

Um einen Anhalt für die geleistete Arbeit der Myozyten zu bekommen, bildeten wir das Integral der Sarkomerverkürzung, dessen Nullpunkt auf der diastolischen Sarkomerlänge der WT Myozyten lag. Unter der Exposition mit Isoprenalin als auch unter Erhöhung der jeweiligen Stimulationsfrequenz war dieses bei den Mybpc3 KI gegenüber den Wildtypen signifikant erhöht (Abbildung 39). Hieraus kann abgeleitet werden, dass zu allen Zeitpunkten die geleistete Arbeit in Mybpc3-KI Myozyten höher als in WT Myozyten war.

Auch das Auftragen von Sarkomerlänge gegen die entsprechende Calcium-Konzentration zeigt, dass in Mybpc3-Myozyten bei jeder gegebenen Calcium-Konzentration eine kürzere Sarkomerlänge zu beobachten ist (Abbildung 39), was a.e. auf die erhöhte Calcium-Affinität der Myofilamente zurückzuführen ist.

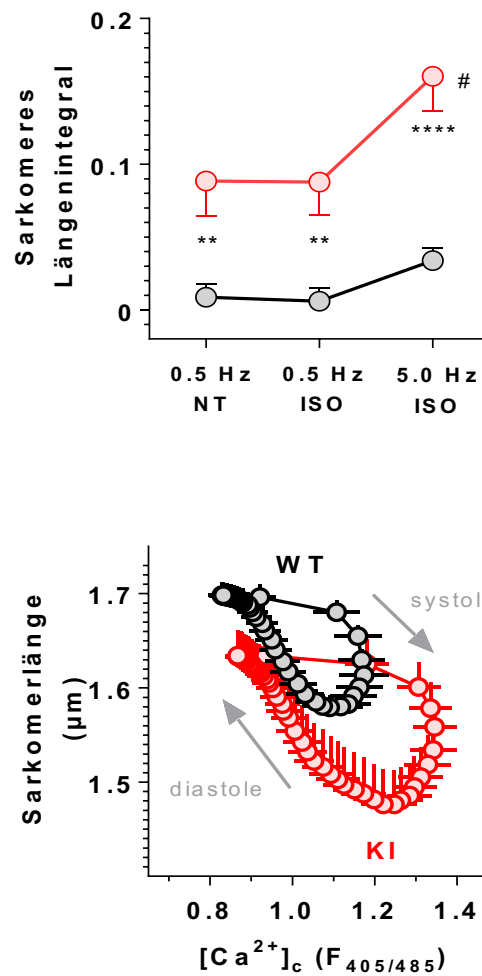


Abbildung 39: Sarkomeres Längenintegral und Sarkomerlänge aufgetragen gegen die zytosolischen Calciumkonzentrationen der Myozyten von WT und Mybpc3-KI. Sarkomes Längenintegral zu den Messzeitpunkten 0,5 Hz mit NT, 0,5 Hz mit Isoprenalin und 5 Hz mit Isoprenalin signifikant bei den transgenen Tieren erhöht. Bei den Mybpc3 KI besteht ein Trend Richtung verstärkter Sarkomerverkürzungen bei gleichzeitig höheren Calciumkonzentrationen. Alle dargestellten Ergebnisse sind anhand der n-Zahlen als Mittelwerte \pm SEM errechnet. n-Zahlen sind Myozytenzahlen, 24 für WT, 20 für Mybpc3-KI. #= $p < 0.0005$ "2wayANOVA". **= $p < 0.001$; ***= $p < 0.0001$ "Bonferroni posttests".

4.1.5 Intrazelluläre Natriumkonzentrationen der Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten

Abbildung 40 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der SBFI-Messungen von WT und Mybpc3 KI Myozyten. Zum einem sind die gemittelten Kompletterläufe der Messprotokolle dargestellt, zum anderen wurden anhand dreier gesetzter Messpunkte absolute Mittelwerte der Natriumkonzentrationen beider Versuchsgruppen ermittelt. Die Messpunkte setzten sich dabei aus dem zu Beginn unter NT und 0,5 Hz laufenden Erstabschnitt, der physiologischen Erhöhung der Arbeitslast (ISO und 5 Hz) und dem abschließenden Auswaschen von Isoprenalin mit NT unter einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz zusammen.

Bei diesen Messungen erkannten wir eine bereits basal erniedrigte Natriumkonzentration bei den Myozyten der Mybpc3-KI Tiere. Bei beiden Versuchsgruppen stieg das freie, intrazelluläre Natrium unter Isoprenalinzugabe und Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz an. Zum Ende der Arbeitslastsimulation sahen wir darunter einen signifikanten Unterschied zwischen den Natriumkonzentrationen ($p < 0,05$, Bonferroni posttest). Diese signifikante Divergenz bestand bis zum nachfolgenden kompletten Auswaschen von Isoprenalin ($p < 0,05$, TwoWay ANOVA).

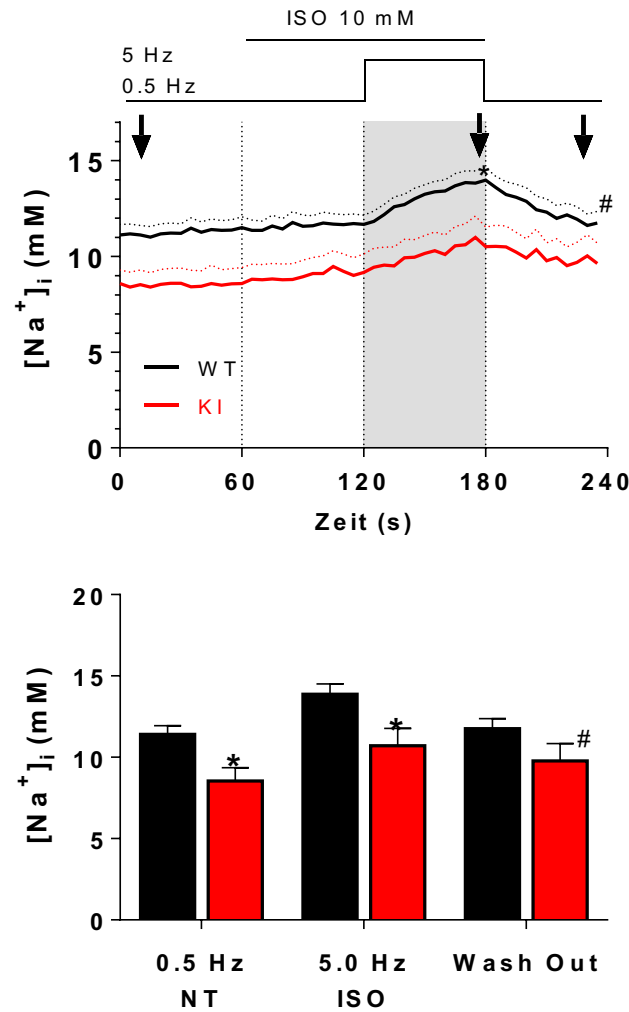


Abbildung 40: Freies, intrazelluläres Na^+ der WT und Mybpc3-KI Myozten. Oben dargestellt als komplettes Verlaufsprotokoll, unten als Mittelwerte mit SEM zu definierten Messpunkten. Zwischen beiden Versuchsgruppen entstanden während den Ruhebedingungen (NT, 0,5 Hz) und der physiologischen Erhöhung der Arbeitslast (5.0 Hz, ISO) signifikante Unterschiede. Auch durch den Vergleich der Messwerte während der Auswaschphase von Isoprenalin (Wash Out) mit NT entstanden Signifikanzen. Alle Werte wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SBFI ermittelt, Messzeitpunkte mit entsprechenden Pfeilen oben dargestellt. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben, WT (n=11) und Mybpc3-KI (n=8).

4.1.6 Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H/ NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD

Abbildung 41 zeigt die Verläufe des mitochondrialen Redoxstatus im Vergleich Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten. Die Autofluoreszenz von NAD(P)H nimmt unter Oxidation ab, die von FAD hingegen zu. Der basale Redoxstatus von NAD(P)H/NADP(P)⁺ sowie von FADH₂/FAD war demnach in den KI- gegenüber den WT Myozyten jeweils oxidiierter. Nach Zugabe von Isoprenalin und Anheben der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz kam es in den KI Myozyten zu einer deutlich verstärkten Oxidation von NAD(P)H und FAD, während diese Werte in WT Myozyten weitgehend konstant blieben. Die Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen blieben während der Auswaschphase bestehen ($p < 0.05$ WT vs. KI (2-way ANOVA) und $p < 0.05$ WT vs. KI (Bonferroni post-test)).

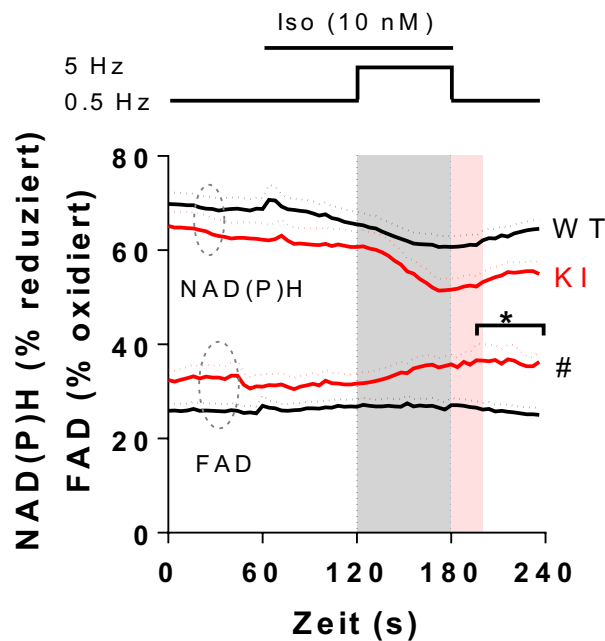


Abbildung 41: Verlauf des Redoxstatus der Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten unter Hinzugabe von Isoprenalin und Frequenzerhöhung (grauer Bereich). Bereits tendenziell basal oxidiierter Redoxstatus der transgenen Tiere, unter Arbeitslasterhöhung progredient. Zu Ende des Versuchsprotokolls unter Basalfrequenz und Isoauswaschung (rosa Bereich) signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben, Mybpc3 KI n=20 und Wildtyp n=25. Dargestellte Messwerte der sich gegenläufig verhaltenden Fluoreszenzen von NAD(P)H und FAD als errechnete Mittelwerte \pm SEM.

Da sich die Autofluoreszenzen bei Oxidation bzw. Reduktion gegenläufig verhalten, ist das Verhältnis von NAD(P)H zu FAD ein sensibler, ratiometrischer Parameter für den mitochondrialen Redoxstatus. Dieses Verhältnis von NAD(P)H zu FAD war bereits basal oxidiert in KI Myozyten (Abbildung 42). Unter Isoprenalin und 5 Hz verstärkte sich die Oxidation deutlicher in KI- als in WT-Myozyten. Gegen Ende des Messprotokolls ergab sich analog zu den einzelnen Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD eine signifikant stärkere Oxidation zwischen beiden Versuchsgruppen ($p < 0.05$ WT vs. KI (2-way ANOVA) und $p < 0.05$ WT vs. KI (Bonferroni post-test)).

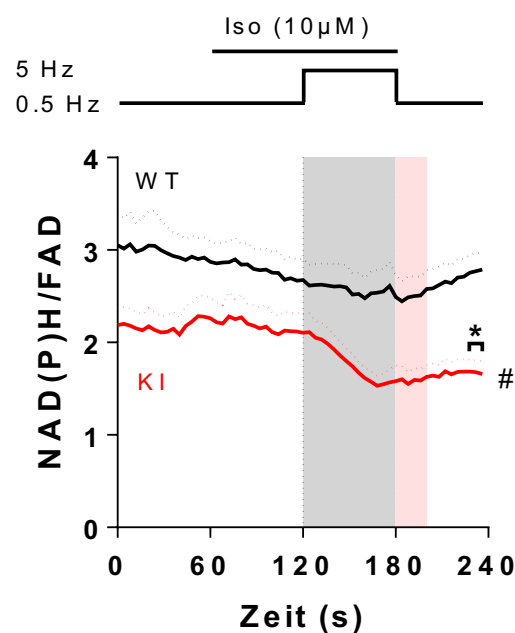


Abbildung 42: Ratiometrische Darstellung der Autofluoreszenzverhältnisse von NAD(P)H und FAD der Mybpc3 KI (n=20) und Wildtyp (n=25) Myozyten. Ergebnisse als Mittelwerte + SEM dargestellt. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben. Bereits zu Beginn stärkere Oxidation der Redoxäquivalente bei den Mybpc3-KI Myozyten. Bei beiden Versuchsgruppen unter basalen Bedingungen mit 0,5 Hz konstante Ratio von NAD(P)H zu FAD. Veränderung des Redoxstatus in Richtung Oxidation unter Isoprenalingabe und Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz, allerdings deutlicher bei den Mybpc3-KI Myozyten. Anschließende Regeneration der Redoxstatus bei beiden Gruppen, die Wildtyp Myozyten erholen sich dabei schneller Richtung Reduktion als die Mybpc3-KI Myozyten. Hierbei ermittelte Signifikanz.

4.1.7 Mitochondriales Membranpotential

Die Aufzeichnung und Detektion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurde unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs TMRM durchgeführt. Während des Messprotokolls von TMRM wird dabei die dargestellte Fluoreszenzintensität (F) als gemessenes Signal zum jeweiligen Zeitpunkt auf die unter Basalbedingungen bei 0,5 Hz zu Beginn gemessene Fluoreszenzintensität (F_0) bezogen. Durch diesen Bezug wird zu jedem Messzeitpunkt ein dementsprechendes Verhältnis $[F/F_0]$ generiert, welches eine sensitive Aussage über mögliche Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials erlaubt. Die erarbeiteten Parameter dieses Membranpotentials zeigten nahezu konstant gleiche Werte über den gesamten Verlauf der Messungen in beiden Versuchsgruppen (Abbildung 43). Auch nach Erhöhung der Arbeitslast (5 Hz und Gabe des β -AR Agonisten Isoprenalin) waren keine Unterschiede detektierbar.

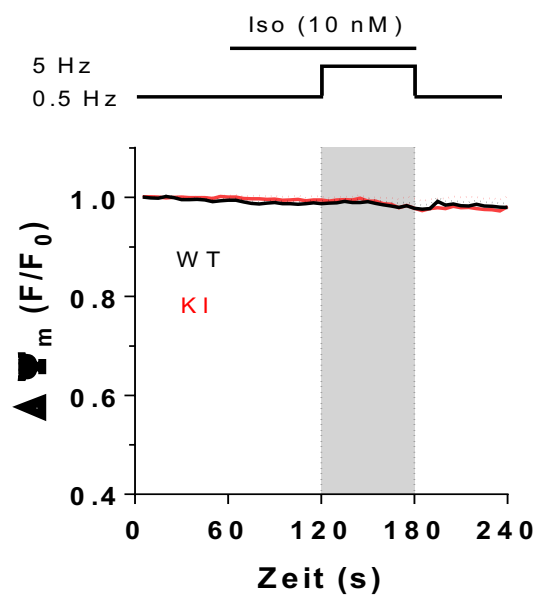


Abbildung 43: Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ der Mybpc3 (n=20) und Wildtyp (n=21) Myozyten. Parameter mit Hilfe von TMRM⁺ gemessen. Über die Zeit wird das TMRM⁺-Signal als Intensität des Fluoreszenzsignals F durch die basale Fluoreszenz von TMRM⁺ (F_0) aufgezeichnet. Darstellung der Mittelwerte und des +/- SEM. In beiden Gruppen blieb $\Delta\Psi_m$ während der gesamten Messung unverändert zwischen beiden Versuchsgruppen. n-Zahlen sind als Myozytenanzahl angegeben. Da TMRM⁺ ein ratiometrischer Farbstoff ist, kann keine Aussage über die Ausgangssituation der Messungen gestellt werden.

4.1.8 Mitochondriale Superoxidproduktion

Die mitochondriale Superoxidproduktion wurde als zentraler Bestandteil unserer Experimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX gemessen. Hierdurch wollten wir die Auswirkung der Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und damit auch indirekt auf die Aktivität der MnSOD innerhalb der Mitochondrien erfassen. Analog zu den Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotentials mit TMRM wurde auch bei diesen Aufzeichnungen zunächst eine basale, unter 0,5 Hz und NT generierte Fluoreszenzintensität (F_0) ermittelt. Während des gesamten Messprotokolls wurde die Fluoreszenzintensität (F) untersucht und diese fortan auf die Fluoreszenzintensität (F_0) quantitativ bezogen. Dabei stellte sich heraus, dass die Rate der Superoxidproduktion bereits basal zwischen beiden Versuchsgruppen nahezu identisch war (Abbildung 44). Die Hinzugabe von Isoprenalin und die Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz erhöhte die $\cdot O_2^-$ Bildung in beiden Versuchsgruppen nahezu gleichwertig. Es entstanden dementsprechend keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

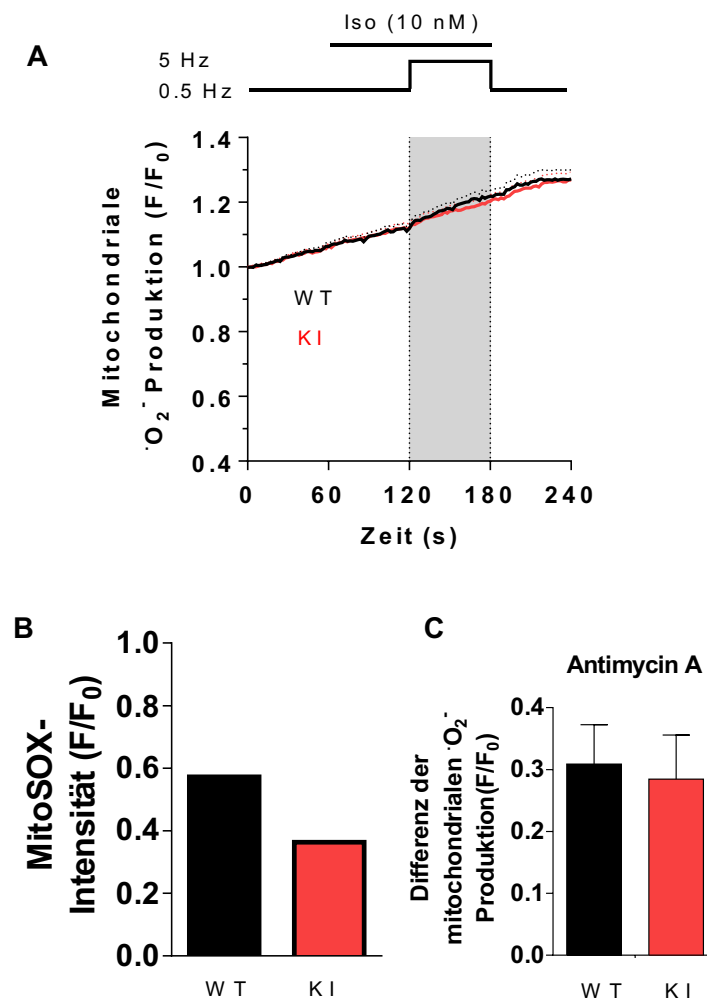


Abbildung 44: Mitochondriale Superoxidproduktion der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten, gemessen mit Hilfe von MitoSOX (A). Verlauf der MitoSOX Fluoreszenz in WT und Mybpc3-KI Myozyten während des Stimulationsprotokolls bei initial 0.5 Hz Feld-Stimulation, nach Zugabe von Isoprenalin (Iso; 10 nM) und anschließend Anheben der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz. Nach einer Minute Reduktion der Stimulationsfrequenz auf 0.5 Hz. (B) Durchschnittlich ermittelte Intensität des basalen MitoSOX Signals vor Beginn des Experiments in Mybpc3 und Wildtyp Myozyten, dargestellt die Mittelwerte als Balkendiagramme (schwarz = WT; rot = Knock-In-Tiere). (C) Anstieg der MitoSOX Fluoreszenz nach Zugabe von Antimycin A in Mybpc3 und Wildtyp Myozyten nach Abschluss des Experimentes zur Kalibrierung (schwarz = WT; rot = Knock-In-Tiere). Darstellung der Mittelwerte + SEM. n-Zahlen als Myozytenzahlen von Mybpc3 (n=25) und Wildtypen (n=24).

Die Kalibrierung der MitoSOX-Messsignale wurde anhand einer Positivkontrolle unter Verwendung von Antimycin A durchgeführt (Abbildung 44), welches eine Produktion von Superoxid am Komplex III der Atmungskette als Positivkontrolle provoziert. Die Antimycin A Werte zeigten keine Unterschiede zwischen WT vs. Mybpc3-KI, was auf eine vergleichbare Kapazität der Atmungskette, Superoxid zu produzieren, zwischen beiden Genotypen anzeigt.

Die mitochondrial gebildeten $\cdot\text{O}_2^-$ Anionen werden bekannterweise durch die beschriebene Mangan-Superoxid-Dismutase unabhängig vom Redoxstatus von NADPH effizient in H_2O_2 umgewandelt (Kohlhaas and Maack, 2011). In Anbetracht der Tatsache, dass die durch MitoSOX detektieren Superoxidanionen damit losgelöst von NAD(P)H und den Redoxäquivalenten gebildet werden, untersuchten wir im nächsten Schritt die Produktion von H_2O_2 , welches NADPH-abhängig eliminiert wird.

4.1.9 Mitochondriale H_2O_2 Produktion

Um eine Aussage über die tatsächliche antioxidative Kapazität der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten und deren Mitochondrien stellen zu können, untersuchten wir die H_2O_2 Produktion beider Versuchsgruppen. Hierzu wurde das bereits etablierte Messprotokoll verwendet. Um die Produktion von H_2O_2 zu detektieren, wurde die Myozyten zuvor mit dem Farbstoff DCF beladen.

Im Gegensatz zu den Messungen der Superoxidproduktion mit MitoSOX zeigten die Messergebnisse mit DCF einen deutlichen Anstieg der H_2O_2 -Produktion in den Mybpc3 Knock-In Myozyten, sowohl basal als auch insbesondere während β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin und 5 Hz. Die H_2O_2 Produktion war dabei bereits gegen Ende der Arbeitslasterhöhung zwischen beiden Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich ($p < 0.01$ im Bonferroni posttest). Im Rahmen der anschließenden Auswasch-Phase stieg dieser Unterschied weiter deutlich signifikant an ($p < 0.0005$ "2wayANOVA" und $*** = p < 0.0001$ "Bonferroni posttests").

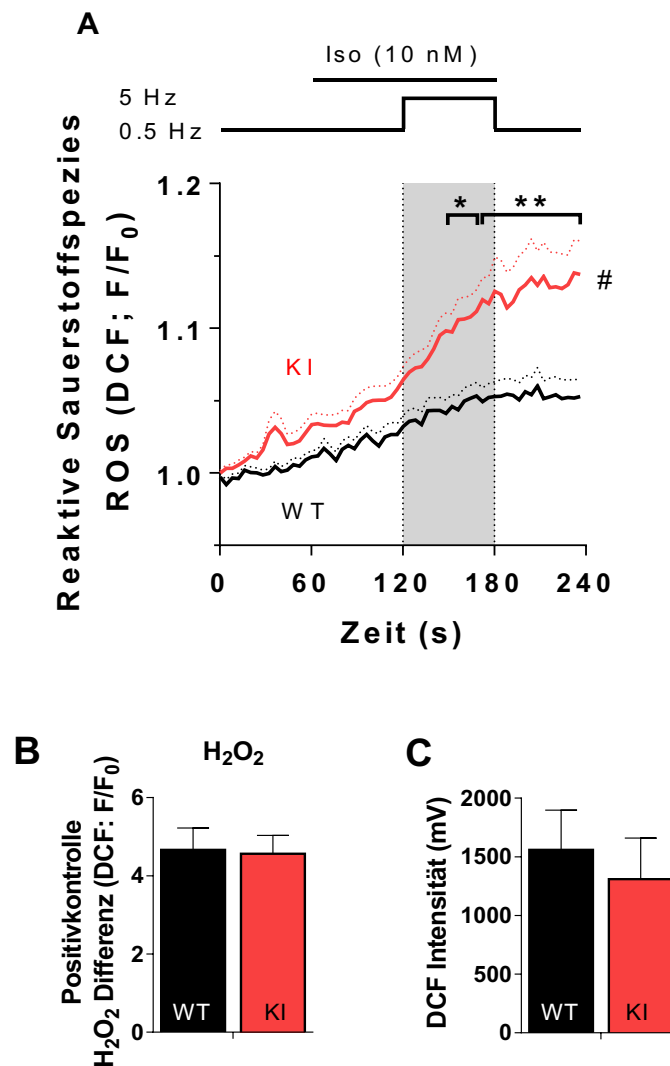


Abbildung 45: Mitochondriale H₂O₂-Produktion der Mybpc-KI und Wildtyp Myozyten, gemessen mit DCF (A). Bereits zu Beginn unterschiedliche basale Bildung von Wasserstoffperoxid in beiden Versuchsgruppen. Unter Zunahme der Arbeitslast Erhöhung der H₂O₂ Produktion in beiden Gruppen, bei den Mybpc3-Myozyten jedoch deutlich stärker. Signifikante Unterschiede am Ende der erhöhten Stimulationsphase und während des Washouts. Positivkontrolle ohne Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich Differenz der H₂O₂ Produktion (B) und DCF Intensität (C). Darstellung der Mittelwerte + SEM. n-Zahlen als Myozytenzahlen der Mybpc-KI (n=24) und Wildtypen (n=43).

Dieses Resultat deutet zusammen mit den beiden vorherigen Ergebnissen des oxidierten Redoxstatus der Mybpc3-Knock-In-Myozyten und der unveränderten Superoxidionen

Produktion darauf hin, dass in den Mybpc3-Knock-In-Myozyten die antioxidative Kapazität im Vergleich zu den WT vermindert, aber die Atmungskette intakt ist.

Um diese reduzierte antioxidative Kapazität und deren Verhältnis und Abhängigkeit zum mitochondrialen Redoxstatus noch deutlicher heraus zu stellen, korrelierten wir die Daten der H_2O_2 Produktion mit den zuvor ermittelten Messwerten des mitochondrialen Redoxstatus (Abbildung 46). Bei Gegenüberstellung dieser Parameter wird deutlich, dass insbesondere während der Oxidation von NAD(P)H die H_2O_2 Emission in Knock-In Myozyten zunimmt. Es zeigt sich ferner ein inverses Verhältnis von mitochondrialem Redoxstatus zu H_2O_2 Akkumulation, welches in den Mybpc3-KI-Myozyten in Richtung Oxidation und erhöhter H_2O_2 Akkumulation verschoben ist. Das bedeutet, dass der mitochondriale Redoxstatus der Mybpc3-KI-Myozyten unter gleicher Arbeitslast im Vergleich zu den WT-Myozyten stärker Richtung Oxidation bei gleichzeitiger vermehrter H_2O_2 Bildung verlagert ist.

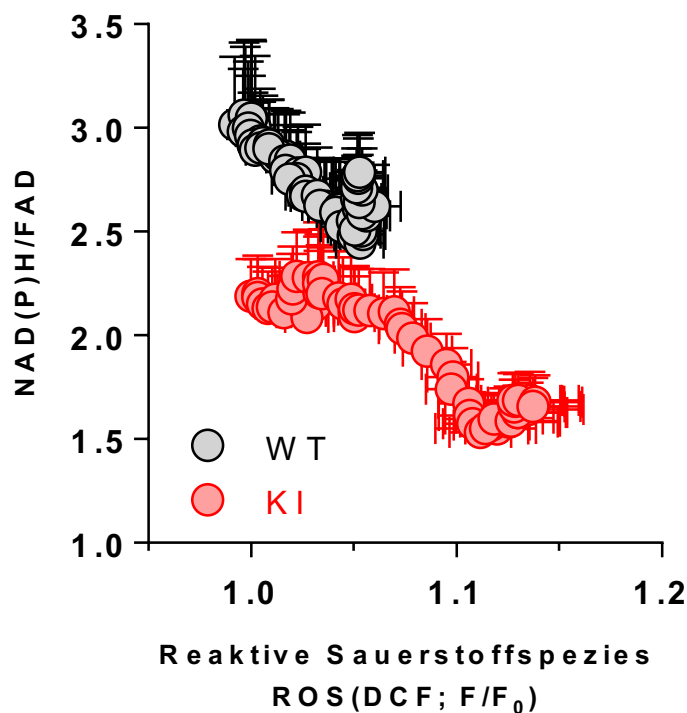


Abbildung 46: Wechselwirkung zwischen mitochondrialem Redoxstatus (y-Achse) und H_2O_2 -Akkumulation (x-Achse) der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten. Inverser Zusammenhang beider Parameter bei beiden Versuchsgruppen. Verlagerung der Relation in Richtung Oxidation der Redoxäquivalente und erhöhter H_2O_2 Produktion bei den Mybpc3-Knock-In-Myozyten. Indem man das Verhältnis von NAD(P)H/FAD und die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies gegeneinander aufträgt, wird die Abhängigkeit der Oxidation der Pyridinnukleotide in Bezug auf die gemessene Kumulation der reaktiven Sauerstoffspezies noch deutlicher dargestellt.

4.2 Messungen an isolierten Mybpc3-KI und Wildtyp Mitochondrien

Um zu untersuchen, ob die detektierten Unterschiede ggf. auf eine mitochondriale Dysfunktion *per se* zurückzuführen sind, erfassten wir in isolierten Mitochondrien von Mybpc3 KI- und Wildtyp-Mäusen die mitochondriale Atmung, die Bildung von Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) und die Emission von H_2O_2 sowohl in An- (State 3) und Abwesenheit (State 2) von ADP.

Um die Intaktheit der Atmungskette zu testen, analysierten wir den Sauerstoffverbrauch mittels Clark Elektrode an isolierten Mitochondrien in der Abwesenheit und Gegenwart von ADP. Auch hier verglichen wir die Mitochondrien der Mybpc3-Knock-In- mit denen der WT Mäuse (Abbildung 47).

Diese zu einem unterschiedlichen Sauerstoffverbrauch führenden Zustände wurden in der Gegenwart der Substrate Pyruvat und Malat (P/M, jeweils 5 mM), ADP zur Aktivierung der Atmung und DNP/ Oligomycin zur Entkopplung der Atmung erreicht und zwischen beiden Versuchsgruppen verglichen.

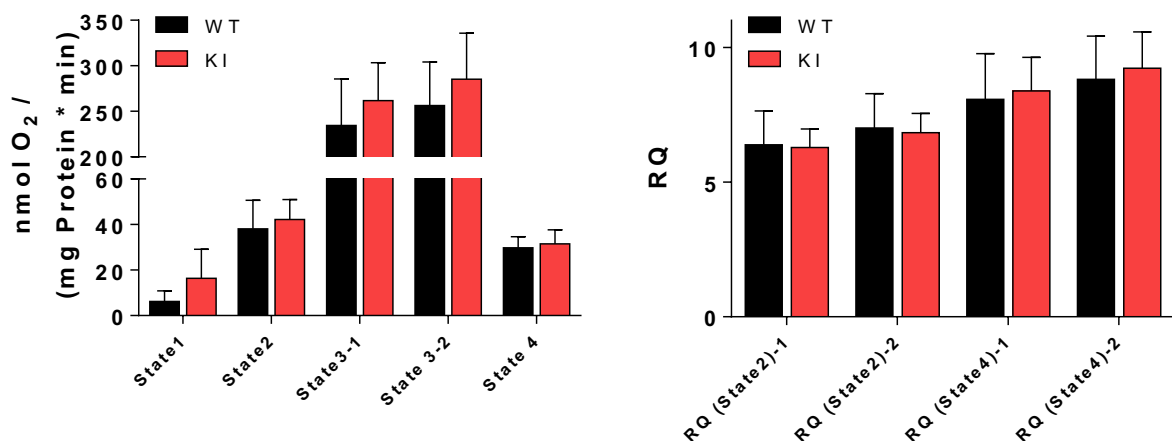


Abbildung 47: Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von Mybpc3 und Wildtyp Myozyten in An- und Abwesenheit von ADP (State 2 und State 3) und Respirationsquotient (RQ) der Mitochondrien. Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen.

Für alle detektierten Messgrößen ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Mybpc3-KI und Wildtypen.

Im sog. „State 1“ ist die Atmung noch gering, da weder Substrate für den Citratzyklus noch ADP zugegen sind. Im State 2 erhöht sich die Atmung gering durch die Zugabe von Substraten für den Citratzyklus (5 mM von Pyruvat und Malat). Erst nach Zugabe von ADP und hierdurch Aktivierung der ATP Produktion an der F₁F₀ ATP Synthase kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Atmungskapazität. Nach Zugabe des ATPase Inhibitors Oligomycin kommt es zum Erliegen der Atmung (trotz weiterer Gegenwart von ADP). Die zum State 2 vergleichbare Restatmung stellt einen Index für die Integrität der Atmungskette dar; eine erhöhte Aktivität im State 2 oder 4 würde auf eine zunehmende Entkopplung der Atmungskette hinweisen, da viel Substrat und Sauerstoff - jedoch kein ADP und P_i - für die oxidative Phosphorylierung vorliegen. Die Komponenten der Elektronentransportkette (ETC) sind dadurch maximal reduziert. Die State 3 Atmung wurde in Relation zum State 2 bzw. State 4 zur Ermittlung des respiratorischen Quotienten RQ gesetzt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen WT und Mybpc3-KI Mitochondrien unter allen Atmungsbedingungen, was eine intakte Atmungskettenfunktion sowohl in Mybpc3-KI, als auch in WT-Herzen verdeutlicht.

Analog zu den Untersuchungen der antioxidativen Kapazität von Mybpc3-Knock-In und WT bestimmten wir neben der mitochondrialen Superoxid Produktion die H₂O₂ Emission in isolierten Mitochondrien mittels ESR spin trap und Amplex Red assays (Abbildung 48). Wie bereits bei den Aufzeichnungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs generierten wir durch Zugabe von Pyruvat/ Malat (P/M), ADP und DNP/ Oligomycin mitochondriale Zustände, in denen es insgesamt zu verschiedenen Bildungsraten von Superoxiden und H₂O₂ kam.

Auch hier entstanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese Erkenntnis weist darauf hin, dass die erhöhte ROS Emission in intakten Herzmuskelzellen auf die Interaktion der Mitochondrien mit extramitochondrialen Faktoren in den Zellen zurückzuführen sein muss.

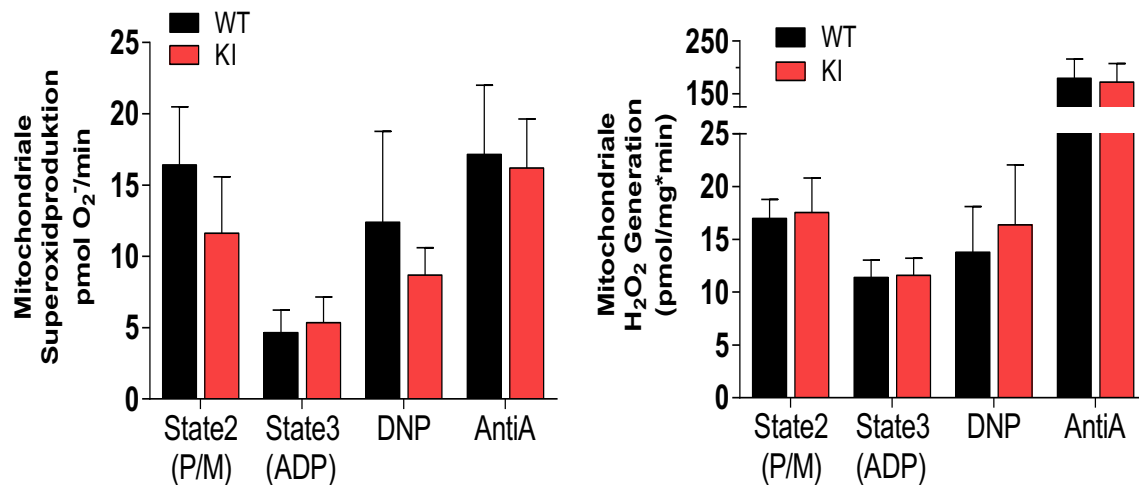


Abbildung 48: Mitochondriale Superoxid- und H₂O₂ Produktion in isolierten Mitochondrien der Mybpc3 und Wildtyp Myozyten. Mitochondriale $\cdot\text{O}_2^-$ Entstehung gemessen mittels ESR spin trap. Die mitochondriale H₂O₂ Emission wurde mittels Amplex Red assays untersucht. Messwerte in Abhängigkeit der Gegenwart von Pyruvat/ Malat (P/M), ADP und DNP/ Oligomycin. Positivkontrolle mit Antimycin A. n-Zahlen = Tieranzahlen, jeweils n=5 pro Versuchsgruppe. Keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Im Rahmen dieser mitochondrialen Atmungsmessungen untersuchten wir zudem das mitochondriale Membranpotenzial beider Versuchsgruppen unter verschiedenen energetischen Bedingungen durch Inkubation von Mitochondrien mit TMRM (Abbildung 49). Auch hier entstanden im gesamten Protokollverlauf keine Unterschiede.

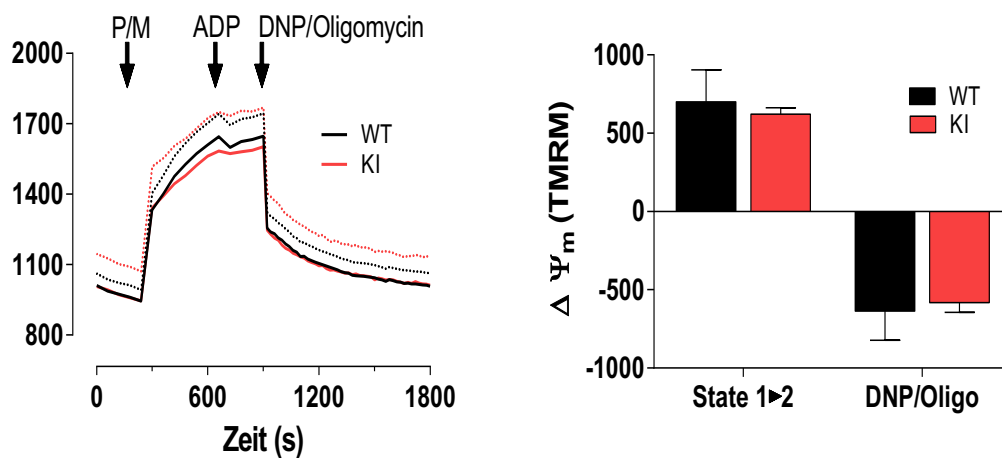


Abbildung 49: Membranpotential der isolierten Mitochondrien von Mybpc3-Knock-In und Wildtyp in Abhängigkeit der Anwesenheit von Pyruvat/ Malat (P/M), ADP, und DNP/ Oligomycin (Pfeile). Vergleichbarer Messerverlauf in beiden Tiergruppen. n-Zahlen sind Tieranzahlen, Mybpc3 und WT jeweils 5.

Um auszuschließen, dass die erhöhte Calciumsensitivität der Myofilamente wesentlich auf der Mutation des Mybpc3 Gens an sich beruht, führten wir weitere Messungen an Myozyten mit dem Calciumsensitizer EMD durch. Dieser wurde uns freundlicherweise von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

EMD führt zu einer akuten Steigerung der Calcium-Sensitivität der Myofilamente. Chronische Adaptationen und Veränderungen im Rahmen der Pathogenese sollten damit als entscheidende Ursache für die ROS Entstehung im HCM Mausmodell ausgeschlossen werden. In ersten Messungen konnte bereits dargelegt werden, dass sich sowohl die diastolische Vorspannung (diastolische Sarcomerlänge), als auch die Kontraktionskraft (systolische Sarcomerlänge) und die fraktionelle Sarkomerverkürzung (% von diastolischer Sarcomerlänge) konzentrationsabhängig signifikant unter der jeweiligen EMD Behandlung verstärkten (Abbildung 49).

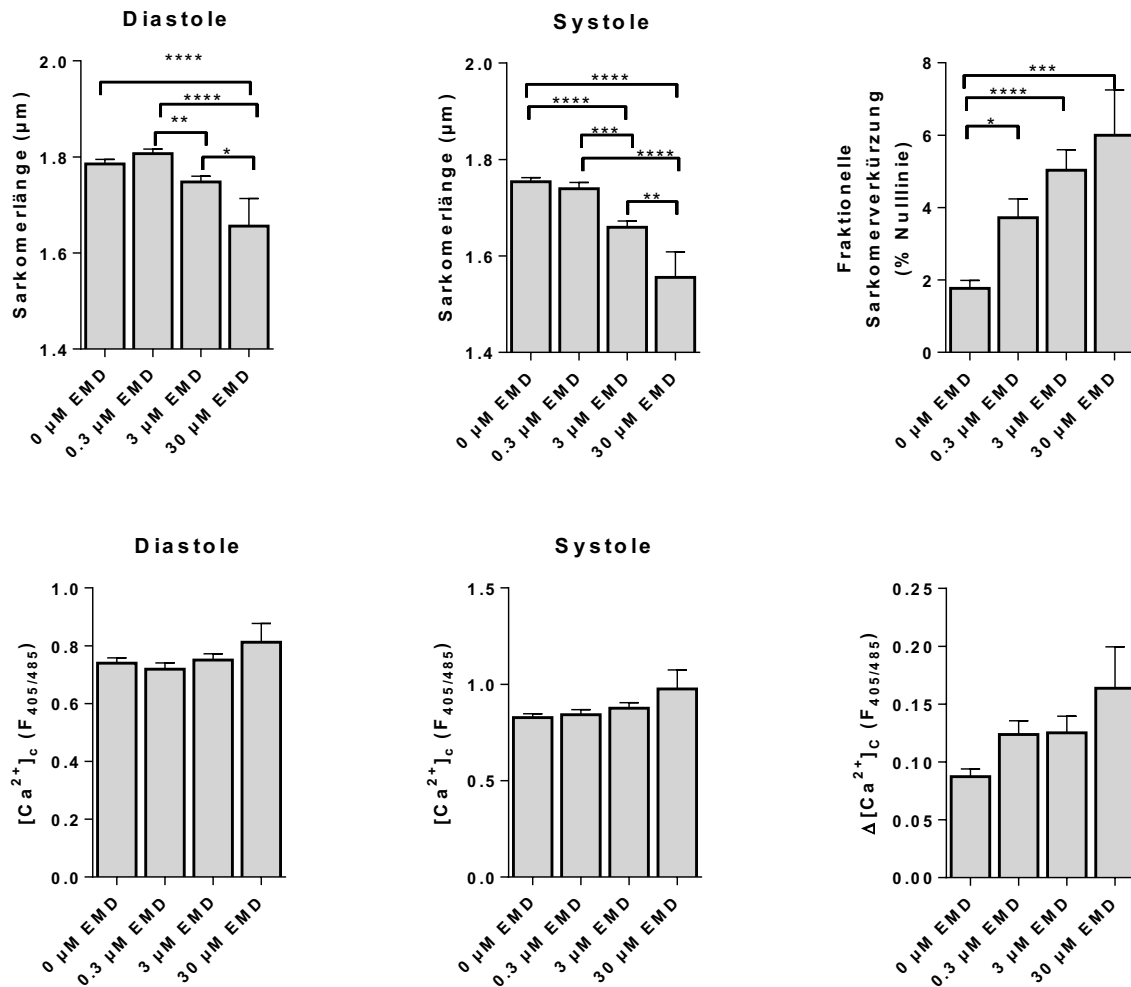


Abbildung 50: Zelllänge und Zellverkürzung unter unterschiedlichen EMD Konzentrationen (oben). Diastolische und systolische intrazelluläre Calciumkonzentration unter unterschiedlichen EMD-Konzentrationen (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM. Die Stimulationsfrequenz betrug dabei konstant 1 Hz. Die Werte wurden jeweils nach einer Inkubationszeit von vier Minuten bestimmt, zu dieser Zeit war der jeweilige EMD-Effekt stabil. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen EMD-Konzentrationen hinsichtlich Sarkomerlängen und fraktioneller Sarkomerverkürzung. Kein Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentrationen. n-Zahlen als Myozytenzahlen angegeben. Oben: 47 für 0 µM; 29 für 0,3 µM; 37 für 3 µM; 7 für 30 µM. Unten: 29 für 0 µM; 17 für 0,3 µM; 24 für 3 µM; 4 für 30 µM.

Ferner untersuchten wir, ob und wie die Behandlung mit EMD den mitochondrialen Redoxstatus beeinflusst. Hierzu behandelten wir isolierte Kardiomyozyten sukzessiv mit den drei EMD-Konzentrationen 0,3 und 3 µM oder 3 und 30 M.

Wir zeichnen die Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD mit entsprechend anschließender Kalibrierung auf.

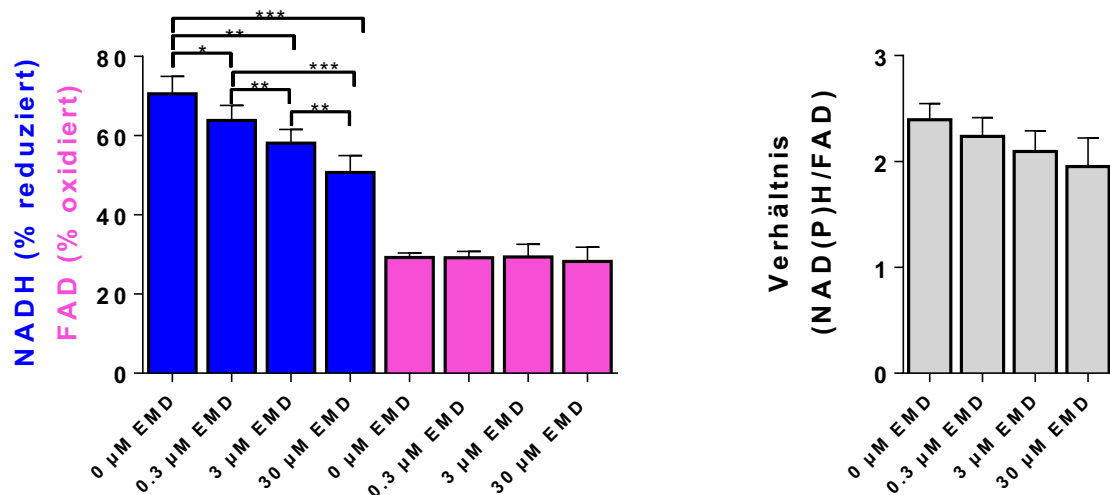


Abbildung 51: Autofluoreszenzen von NADH und FAD in Abhängigkeit zur EMD Konzentration 0 µM, 0,3µM, 3 µM und 30 µM. NADH wird dabei konzentrationsabhängig vermehrt oxidiert, FAD bleibt dagegen unverändert. Das Verhältnis von NAD(P)H zu FAD bleibt damit unverändert bei tendenzieller Neigung zu vermehrter Oxidation. Allerdings überlebten nur wenige Zellen dieses Protokoll und konnten im Anschluss nicht mehr kalibriert werden. n-Zahlen als Myozyten angegeben, n= 8.

Entsprechend verkürzten wir das Protokoll und verwendeten fortan die EMD-Konzentrationen 0,3 und 3 µM oder 3µM und 30 µM (Abbildung 51). Unter den jeweiligen Konzentrationen zeigte sich EMD-konzentrationsabhängig sowohl eine deutliche Oxidation von NAD(P)H, sowie des mitochondrialen Redoxstatus - dargestellt als Verhältnis von NAD(P)H zu FAD.

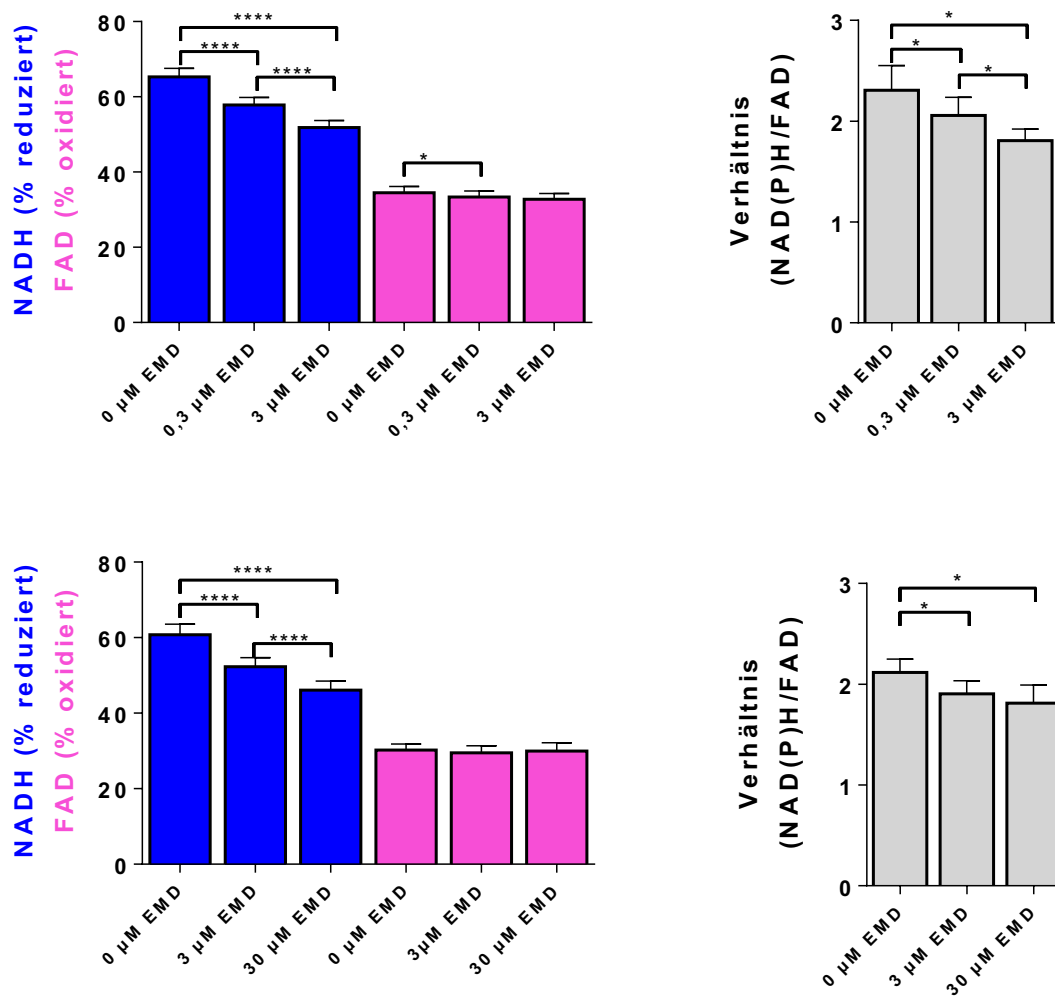


Abbildung 52: NAD(P)H und FAD Redoxstatus bei unterschiedlichen EMD-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der jeweiligen Oxidation des Redoxstatus. n-Zahlen als Myozyten angegeben. Oben: n = 47 für Messprotokoll mit 0 µM, 0,3 µM und 3 µM. Unten: n = 27 für Messprotokoll mit 0 µM, 3 µM und 30 µM.

Die Autofluoreszenz von FAD präsentiert sich generell um ca. den Faktor drei- bis fünfmal niedriger als die von NAD(P)H. Die erklärt das fehlende Ansteigen der jeweiligen FAD-Intensität. Dabei manifestierten sich die Veränderungen der NAD(P)H Autofluoreszenz unter EMD-Behandlung entsprechend stärker.

Wir schlussfolgern, dass die durch EMD ausgelöste verstärkte systolische Kontraktion und diastolische Vorspannung eine gesteigerte Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus bewirkt.

5. Diskussion

5.1 Rolle einer erhöhten Calciumsensitivität in Mybpc3 KI Myozyten und HCM

Im Zuge dieser Arbeit konnten wir in einem etablierten HCM-Mausmodell (Mybpc3 KI) eine signifikante diastolische Verkürzung der Sarkomerlänge nachweisen. Diese beruhte auf einer erhöhten Calciumsensitivität der Myofilamente, was eine verstärkte Kontraktilität der Sarkomere während der Diastole zur Folge hatte. Eine vermehrte Calciumsensitivität der Myofilamente konnte bereits 2002 durch Harris et al. in einem anderen HCM-Tiermodell unter einer Mybpc3-Mutation beobachtet werden (Carrier et al., 2015; Harris et al., 2002). Die durch die gesteigerte Calciumsensitivität entstehende vermehrte diastolische Wandspannung führt dazu, dass sich auch die nachfolgend systolische Kraftentwicklung vergrößern muss – dieser Prozess kostet entsprechend Energie (Baudenbacher et al., 2008). Dem zu Folge könnte die erhöhte Calciumaffinität der Myofilamente und die konsekutive Hyperkontraktilität der Myozyten von Mybpc3 KI zu einem steigenden Energieverbrauch und einem energetischen Ungleichgewicht führen (Abbildung 54). Ein Vergleich zweier Tiermodelle von HCM und DCM durch Davis et al. konnte zeigen, dass bei HCM eine Vergrößerung-, und bei DCM einer Reduktion des Kraft-Zeitintervalls besteht, welches als Integration der systolischen und diastolischen Aktin-Myosininteraktion und somit des Energieverbrauchs anzusehen ist (Davis et al., 2016). Diese Beobachtungen untermauern unsere eigenen Ergebnisse und suggerieren, dass es bei HCM-typischen Mutationen zu einer gesteigerten Kraftentwicklung und einem gesteigerten Energieverbrauch während der elektromechanischen Kopplung kommt.

Aber auch eventuelle physiologische Kompensationsmechanismen könnten durch die vermehrte Calciumaffinität der Myofilamente verhindert werden. Unter Arbeitslastserhöhung werden möglicherweise ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} Konzentrationen durch eine vermehrte Calciumaffinität der Myofilamente abgepuffert (Schober et al., 2012). Da die mitochondriale Ca^{2+} Aufnahme wiederum wesentlich von der Menge des $[\text{Ca}^{2+}]_c$ abhängt (Belus et al., 2008) kann das mitochondriale Ca^{2+} nicht adäquat unter Arbeitslastserhöhung ansteigen, um beispielsweise die Aktivität des Citratzyklus bedarfsgerecht zu triggern (Kohlhaas et al., 2017). Passend hierzu sahen wir tendentielle, aber nicht signifikant niedrigere mitochondriale

$[Ca^{2+}]_m$ -Spiegel bei allerdings ebenso tendentiell reduzierten zytosolischen $[Ca^{2+}]_c$ -Spiegel in den Mybpc3 KI Mäusen. Dieser fehlend kongruente Anstieg des mitochondrialen Calciums unter vermehrter Arbeitslast führt zu einem Ungleichgewicht des Redoxstatus.

Resultierend daraus führt die Mybpc3-Mutation unter Arbeitslasterhöhung dazu, dass das mitochondriale Ca^{2+} nicht adäquat ansteigen kann um beispielsweise die Oxidation des Redoxstatus und die energetische Nachfrage auszugleichen (Abbildung 54), wodurch energetisches Ungleichgewicht entsteht. Um diese These weiter zu untermauern, führte unserer Arbeitsgruppe Versuche mit dem mitochondrialen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher-Inhibitor CGP-37157 durch. Durch Blockieren des mitochondrialen Ca^{2+} Ausstroms führt dieser Hemmstoff zum Anstieg des mitochondrialen $[Ca^{2+}]_m$ und damit zu einer gesteigerten Aktivierung des Citratzyklus (Liu and O'Rourke, 2008; Maack et al., 2006).

Frau Olga Otto konnte in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass die Blockade des mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstroms mittels CGP-37157 bei Mybpc3 KI Mäusen unter Arbeitslasterhöhung zur Folge hatte, dass die Entstehung von ROS, die Oxidation der Redoxäquivalente NAD(P)H/FAD und sogar das Auftreten von Arrhythmien reduziert werden konnte (Olga Otto, Promotionsschrift, Homburg 2018). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Diskrepanz zwischen mitochondrialem Ca^{2+} und entstehender Arbeitslast in vermehrter Oxidation der Pyridin Nukleotiden resultiert, die wiederum mit einer erhöhten ROS-Emission und dem vermehrten Auftreten von Arrhythmien verknüpft ist (Abbildung 56). Analog zu unseren Daten des oxidierten Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und $FADH_2/FAD$ in Mybpc3 KI Mäusen konnte unsere Arbeitsgruppe damit zeigen, dass die Oxidation der Pyridinnukleotide eine Folge des Ungleichgewichtes zwischen mitochondrialen ADP und Ca^{2+} bzw. einer mitochondrialen Dysfunktion ist.

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Calcium-Affinität der Myofilamente tatsächlich der entscheidende Faktor für die Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus war, führten wir Experimente an Kardiomyozyten von C57BL/6N Mäusen in der Gegenwart des pharmakologischen Calcium-Sensitizers EMD-57033 durch. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Calcium-Sensibilisierung *per se* die Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus induziert und somit andere Konsequenzen der Mybpc3-Mutation als Ursache für die Redox-Veränderungen unwahrscheinlich machen. Unter der Behandlung mit unterschiedlichen

EMD-Konzentrationen ergaben sich hierbei vergleichbare Veränderungen der Kinetik der Sarkomerverkürzung bei den Mybpc3 KI Myozyten mit verkürzten diastolischen Sarkomerlängen und verstärkten systolischen Verkürzungen der Myofilamente. Diese mechanische Arbeitslasterhöhung unter EMD-Therapie verlief ebenfalls unter unveränderten intrazellulären und damit auch vermutlich mitochondrialen Calciumkonzentrationen. Die vermehrte Calciumsensitivität der Myofilamente verursacht somit ebenfalls eine vermehrte Arbeitslast (und somit ADP-induzierte Oxidation des NADH/FAD Redoxstatus) ohne parallele Aktivierung des Citratzyklus durch mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme. Die Ca^{2+} -Hypersensibilität könnte damit eine wesentliche Ursache für das entstehende mitochondriale Ungleichgewicht zwischen Ca^{2+} und ADP sein. Hinsichtlich der energetischen Dysbalance konnten wir zudem nachweisen, dass das Ausmaß NAD(P)H/FAD Oxidation von der EMD-Konzentration abhing. Gleichzeitig konnte eine durchgeführte Behandlung mit dem NCLX-Inhibitor CGP nicht nur die NAD(P)H/FAD Oxidation, sondern auch das Auftreten von Arrhythmien und die ROS Emission unter Arbeitslasterhöhung merklich verhindern (Olga Otto, Promotionsschrift, Homburg 2018). Dies unterstreicht weiterhin, dass die NAD(P)H Oxidation, ROS Emission und Arrhythmien auf ein Ungleichgewicht zwischen Calcium und ADP in Mitochondrien zurückzuführen sind, welches sich wiederum durch die erhöhte Calcium-Affinität der Myofilamente unabhängig vom zugrundeliegenden Genotyp entwickelt. Die Messergebnisse mit dem Calciumsensitizer EMD erhärten weiterhin das Konzept, dass die durch die erhöhte Calcium-Sensitivität der Myofilamente verursachte diastolische Dysfunktion und die verstärkte systolische Kraftentwicklung die Ursachen für das mitochondrial-energetische Defizit bei HCM darstellen.

Vor der Frage, ob diese energetischen Veränderungen allein spezifische Folgeerscheinungen des Mybpc3 KI Mausmodells oder vielmehr ein allgemeiner Bestandteil eines universellen Pathogenesekonzept der HCM darstellen, führten Mitarbeiter unserer AG weiterreichende Experimente an HCM-Tieren mit einer anderen HCM-spezifischen TNNT2 Mutation an transgenen Mäusen (Tnnt2-I79N) aus, welche bereits in anderen Arbeiten ebenfalls ventrikuläre Arrhythmien unter Arbeitslasterhöhung aufwiesen (Baudenbacher et al., 2008; Huke et al., 2013; Knollmann et al., 2001; Schober et al., 2012). Auch hier zeigte sich gleichwohl im Vergleich zu den Tnnt2-WT gesteigerte NAD(P)H/FAD Oxidation und ROS Emission unter Arbeitslasterhöhung, während sich gleichzeitig ein ebenfalls ähnliches Bild hinsichtlich diastolischer Sarkomerlängen und systolischer Sarkomerverkürzungen ergab

(Olga Otto, Promotionsschrift, Homburg 2018). Auch hier stellten wir eine klare ursächliche Relation von mitochondrialer Oxidation und ROS-Emission fest. Die entstandenen Arrhythmien konnten durch CGP abermals abgedämpft werden, ohne dass dabei die systolische oder diastolische Spannung der Sarkomere verändert wurde (Olga Otto, Promotionsschrift, Homburg 2018). Die Erkenntnisse, dass ungleiche Genotypen mit divergenten Mutationen zu vergleichbaren Konsequenzen für den Redoxstatus und Arrhythmien bei HCM führen können, untermauern gleichwohl die Bedeutung der Mutationen von Sarkomerproteinen in der Pathogenese der HCM und der Genotyp-Phänotyp-Korrelation.

5.2 Rolle der mitochondrialen Dysfunktion in Mybpc3 KI Myozyten

Nachdem die in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Messungen der mitochondrialen Atmung, der Bildung von Superoxiden und die Emission von H_2O_2 nahezu gleiche Ergebnisse zwischen Mybpc3 KI und Wildtyp Myozyten ergaben, konnten auch keine Unterschiede hinsichtlich der mitochondrialen Bildung von $\cdot\text{O}_2^-$ und des detektierten Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) unter dem hier verwendeten Messprotokoll mit vermehrter Arbeitslast festgestellt werden. Dementsprechend kann auf pathophysiologischer Ebene die bereits dargelegte vermehrte Emission von ROS in den Mybpc3 KI Myozyten nicht als Ergebnis einer mangelhaften Funktion der mitochondrialen Atmungskette, noch einer mitochondrialen Dysfunktion oder einer erhöhten Bildung von ROS an sich gedeutet werden. Sowohl im Rahmen von Tiermodellen als auch bei HCM Patienten wurden bisher energetisches Ungleichgewicht und mitochondriale Dysfunktion beobachtet (Vakrou and Abraham, 2014). Auch hier ist nach wie vor unklar, ob die geschädigte Funktion der Mitochondrien eine primäre Ursache per se oder einen sekundären Schaden bei der HCM darstellt (Lucas et al., 2003; Tardiff et al., 1999; Unno et al., 2009; Vakrou and Abraham, 2014), wenngleich gezeigt werden konnte, dass einzelne mitochondriale DNA-Mutationen zu einem nahezu ähnlichen Phänotyp der HCM führen konnten (Vakrou and Abraham, 2014). Die Daten dieser Arbeit suggerieren jedoch, dass etwaigen Schädigungen von Mitochondrien die sarkomerischen Veränderungen vorangehen, die auch in der Abwesenheit von mitochondrialen Defekten erhöhte ROS Emission erklären können. ROS selbst kann jedoch die mitochondriale Funktion wiederum negativ beeinflussen, z. B. durch Oxidation und somit

Inaktivierung der Atmungskette und/oder Aktivierung des permeability transition pore (Halestrap and Richardson, 2015; Murphy, 2009). Eine sekundäre Schädigung von Mitochondrien bei Patienten (oder Tiermodellen) mit HCM erscheint damit nicht unwahrscheinlich.

Auch andere Arbeiten konnten Gründe für ein energetisches Defizit bei HCM identifizieren. Im gesunden Herzen stammen ca. 60-70% des generierten ATP primär aus der mitochondrialen Fettsäureoxidation (Abozguia et al., 2006; Ingwall, 2009; Neely et al., 1972). Allgemein kommt es unter einer zellulären Hypertrophie zur Verschiebung der primären Energiequelle von der Fettsäureoxidation in Richtung Glucoseverbrauch (Coppini et al., 2013). Einige Studien konnten bereits zeigen, dass die mitochondriale Aufnahme von freien Fettsäuren bei Patienten mit HCM verringert ist (Okizaki et al., 2007; Tadamura et al., 1998). Da die Fettsäureoxidation die wesentlichen Substrate des Citratzyklus generiert, könnten besagte Störungen auch die damit verbundene Regenerierung von NADH negativ beeinflussen. Um die Ausmaße des gestörten Metabolismus freier Fettsäuren bei HCM noch weiter zu verdeutlichen, konnte in einem HCM Tiermodell neben einer geschädigten Funktion der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungskapazität auch eine vermehrte ROS-Bildung und oxidativer Stress nachgewiesen werden (Christiansen et al., 2015). Durch die vermehrte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente und den steigenden energetischen Verbrauch pro Kontraktion entsteht ein auf mitochondrialer Ebene wachsender Energiebedarf bei der HCM, der durch die Oxidation von Fettsäuren kaum gegenreguliert werden kann (Ashrafian et al., 2003; Stanley et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von Patienten mit HCM mit Perhexilin, einem Medikament, welches (vermutlich) die Fettsäure-Oxidation in Richtung Glucose-Oxidation verschiebt, sowohl die maximale Leistungsfähigkeit bei HCM Patienten als auch die diastolische Funktion und die kardialen Phosphocreatin/ATP-Spiegel signifikant verbessert werden konnte (Abozguia et al., 2010; Ashrafian et al., 2007).

Nichtsdestotrotz entstanden in den letzten Jahren bei Untersuchungen von HCM Patienten hinsichtlich der primären mitochondrialen Energiequelle sehr unterschiedliche Ergebnisse. Teilweise wurde ein gesteigerter, ein verminderter oder ein gleichbleibender Glucose- oder Fettsäureverbrauch nachgewiesen. Dieses Resultat unterlegt das Bestehen der unterschiedlichen HCM-Phänotypen. Zudem könnten auch unterschiedliche Mutationen

gleichzeitig die Ursache für den divergenten Phänotyp sein. Gleichwohl bleibt ungeklärt, ob die mitochondrialen Enzyme der Fettsäureoxidation eine primäre Rolle in der Ätiopathogenese *per se* einnehmen oder im Nachhinein erst durch entstehende mitochondriale Schäden gehemmt werden (Vakrou and Abraham, 2014).

5.3 Rolle des beschädigten Energiehaushalts in Mybpc3 KI Myozyten und HCM

Im menschlichen Herzen ist die kontinuierliche Versorgung mit ATP durch Mitochondrien von immenser Wichtigkeit, um den energetischen Anforderungen der Myofilamente und deren Kontraktion durchgehend Rechnung zu tragen. HCM-Mutationen *per se* verursachen vermehrte energetische Kosten durch Veränderungen der myofilamentären Spannungsbildung und steigender ATP-Hydrolyse (Blair et al., 2001). Als enzymatische Reaktion übertragen die Kreatinkinasen jeweils eine Phosphoryl-Gruppe von Phospho-Kreatin auf ADP, folglich entsteht ATP als universelle Energiequelle aller Zellen; dieser Schritt scheint bei der HCM in seiner Funktion geschädigt zu sein.

Die in Übereinstimmung zu anderen Arbeiten durch uns registrierte erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente der HCM-Herzen ist mit erhöhten Sauerstoffverbrauch und Energiedefizit assoziiert (Baudenbacher et al., 2008). Bei der folglich gesteigerten ATP-Hydrolyse entsteht vermehrt ADP als Endprodukt der ATP Zersetzung. ADP funktioniert dabei als ein Beiprodukt der myofilamentären ATPase und regt die ATP-Bildung am Komplex V der Atmungskette an. Gleichzeitig aktiviert es als Indikator für eine höhere Energienachfrage die zytosolische Phosphokreatinkinase (CK) an, die daraufhin Phosphoryl-Gruppen von Phospho-Kreatin auf ADP überträgt und damit ATP regeneriert (Balaban, 2009; Saks et al., 2006; Vakrou and Abraham, 2014). Das gebildete ADP fördert gleichzeitig auch den Elektronenfluss über der Atmungskette, in dessen Folge das aus dem Citratzyklus gespeiste NADH oxidiert wird (Baudenbacher et al., 2008).

Konkordant hierzu konnten frühere Arbeiten bei HCM Patienten in bereits klinischen Anfangsstadien mit Mutationen in MYH7, Mybpc3 and TNNT2 Genen oder gar in HCM-Anfangsstadien bis zu 43% niedrigere Konzentrationen der Kreatinkinase (CK), aber auch

niedrigere Spiegel von Phospho-Kreatin (PCr) und ATP feststellen (Abraham et al., 2013; Crilley et al., 2003). Zudem stellt sich der Verhältniswert von Phospho-Kreatin zu ATP im HCM-Tiermodell verringert dar (Abraham et al., 2013; Crilley et al., 2003). Vor diesem Hintergrund gilt es zu beachten, dass die im Verhältnis zu ADP deutlich höheren ATP-Spiegel im Herzen sehr konstant gehalten werden (Viola and Hool, 2017).

Darüber hinaus könnte die von uns beobachtete Oxidation von NADH ebenfalls dazu führen, dass die Resynthese von ATP durch das Fehlen dieses essentiellen Coenzym als Elektronen-Donor nur noch mangelhaft sichergestellt wird. Möglicherweise könnten bei der HCM die Verschiebungen des energetischen Gleichgewichts durch kompensatorisch vermehrte Bereitstellung von Energie mittels Anheben der ATP Spiegel ausgeglichen werden. Die zur Regenerierung von neuem ATP verbundene Förderung der Atmungskette endet allerdings in Oxidation von NADH und NADPH, die antioxidative Funktion der Mitochondrien wird dadurch gehindert (Kohlhaas et al., 2017). Die sarkomerische Spannung bleibt damit erhöht, die Kontraktion und deren Ablauf wird wesentlich gehindert. Durch unzulängliche Wiederbereitstellung von ATP aus $\text{ADP} + \text{P}_i$, vor allem aber durch entsprechend ansteigende ADP-Spiegeln kann die ADP-induzierte myozytäre Kraftentwicklung folglich negativ die sarkomeläre Steifheit der Myofilamente und damit diastolische Dysfunktion beeinflussen. Darüber hinaus fördert ADP die erhöhte myofilamentäre Calcium-Affinität (Sequeira et al., 2015b).

Weitere Studien konnten mit Hilfe von ^{31}P -Magnetresonanzspektroskopie durchgeführten Untersuchungen mit einem unter Arbeitslast reduzierten ATP-Pool im HCM Mausmodell aufzeigen (Javadpour et al., 2003; Spindler et al., 1998). Passend dazu ist als ein möglicher Kompensationsmechanismus die kardiomyozytäre Aufnahme von Glucose und vermutlich die Rolle der Glykolyse zur Energiegewinnung mit einhergehender Bildung von Laktat in betroffenen Herzen von HCM Patienten erhöht (Ashrafian et al., 2003; Javadpour et al., 2003; Spindler et al., 1998; Vakrou and Abraham, 2014).

Der vermehrte ATP-Konsum bei HCM-Herzen führt dazu, dass unter einer Arbeitslasterhöhung nur unzureichende Mengen an ATP bereitgestellt werden. Zelluläre ATPasen, wie die Myosin ATPase, membranöse ATPasen, die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und Ca^{2+} -Pumpen (beispielsweise die SERCA), die ATP für ihre Funktion benötigen, werden dadurch

in ihrer Funktionalität gehemmt (Javadpour et al.; Jung et al., 1998; Spindler et al., 1998). In der Folge entstehen durch die Transportstörungen unphysiologische intrazelluläre Level von $[\text{Na}^+]_i$ und Ca^{2+} , die zu diastolischer Dysfunktion, gehemmter myokardialer Kraftentwicklung und vor allem Arrhythmien führen können (Vakrou and Abraham, 2014; Watkins et al., 2011). Der verminderte Quotient von Phospho-Kreatin zu ATP bei HCM und die damit verbundene verringerte Freisetzung von Energie aus der ATP Hydrolyse ($\Delta G_{\sim\text{ATP}}$) verhindern somit mögliche gegenregulatorischen Mechanismen wie beispielsweise dynamische Veränderungen der Na^+ - beziehungsweise Ca^{2+} Homöostase. Passend hierzu konnten wir im Rahmen unserer Messungen nahezu unveränderte zytosolische und mitochondriale Konzentrationen von Ca^{2+} bei gleichzeitig unveränderten Ca^{2+} Transienten ausmachen. Dies deutet darauf hin, dass die elektronischen Transportmechanismen bei der Entstehung der HCM und die intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen *per se* nicht gestört sind, sondern vielmehr die gesteigerte myofilamentäre Ca^{2+} Affinität und die zugrundeliegende Dysfunktion der Sarkomere einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese darstellt.

In unseren Experimenten konnten wir ferner niedrigere intrazelluläre Na^+ -Spiegel bei den Mybpc3-KI Myozten im Vergleich zu den WT nachweisen. Erniedrigtes $[\text{Na}^+]_i$ verringert gleichzeitig die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (mNCE) und damit auch den mitochondrialen Ca^{2+} Ausstrom (Bay et al., 2013; Liu and O'Rourke, 2008). Durch das zurück gehaltene mitochondriale Ca^{2+} könnte der Citratzyklus seine Aktivität im Umkehrschluss aufrecht erhalten und den energetischen Bedingungen unter Arbeitlasterhöhung anpassen. Dies könnte vor dem Hintergrund des verschobenen mitochondrialen Gleichgewichts zwischen Ca^{2+} und ADP bei HCM ein möglicher Kompensationsmechanismus sein (Abbildung 54).

Zusammenfassend betrachtet lässt sich ein vereinheitlichtes Konzept zum defizitären Energiehaushalt in HCM-Kardiomyozyten sicherlich nicht auf alle Erkrankungsstadien und Phänotypen beziehen. Vielmehr gilt es, die aus den jeweiligen Mutationen resultierenden molekularbiologischen Veränderungen und bei der entstehenden hypertrophen Kardiomyopathie involvierten Signalkaskaden aufzudecken und in ihrem Zusammenhang zu verstehen (Vakrou and Abraham, 2014).

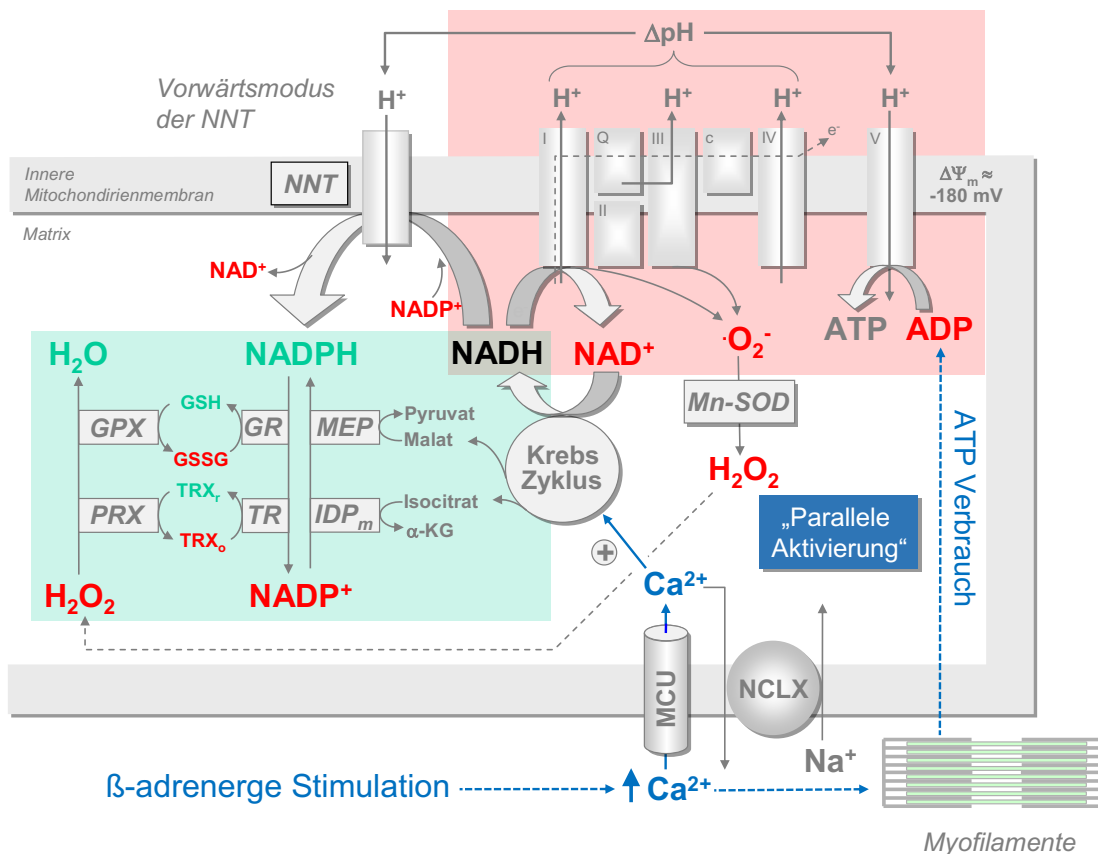


Abbildung 53: Schematische Darstellung der mitochondrialen Energetik, elektromechanischen Kopplung und ROS Produktion bzw. Elimination in Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen.

Normalerweise entsteht im gesunden Herzen im Rahmen von β -adrenerger Stimulation stimuliert das entstehende ADP die mitochondriale Atmungskette und verbraucht NADH. Gleichzeitig wird über den mitochondrialen Calciumeinstrom die Stimulation des Citratzyklus und damit die Regeneration von oxidiertem NAD^+ zu NADH sichergestellt. Diese parallele Aktivierung und Gleichschaltung von energieverbrauchenden und gleichzeitig regenerativen Prozessen führt letztlich zu einer Verschiebung des NADH/NAD^+ Redox Status Richtung Reduktion unter gleichbleibendem Verhältnis von ATP zu ADP während verschiedener Arbeitslasten. Durch die vermehrte Ca^{2+} Affinität der Myofilamente bei HCM kann das mitochondriale Ca^{2+} nicht adäquat ansteigen. Der ADP-Einfluss am energetischen Gleichgewicht vergrößert sich, Verhältnis von NADH zu NAD^+ verschiebt sich Richtung Oxidation. NADH fehlt dadurch für die Aufrechterhaltung der antioxidativen Kapazität.

$\Delta\Psi_m$, Mitochondriales Membranpotential; Mn-SOD, Mn^{2+} -abhängige Superoxid Dismutase; PRX, Peroxiredoxin; GPX, Glutathion Peroxidase; TRXr/o, reduziertes/oxidiertes Thioredoxin; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; TR, Thioredoxin Reduktase; GR, Glutathion Reduktase; IDPm, mitochondriale NADP⁺-abhängige Isocitrat Dehydrogenase, MEP, Malat-Decarboxylase; α -KG, α -Ketoglutarat; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} Uniporter; NCLX, Na^+/Ca^{2+} Austauscher. (Quelle: Energetic mismatch and mitochondrial reactive oxygen species cause arrhythmias in hypertrophic cardiomyopathy, Kohlhaas et al., 2017)

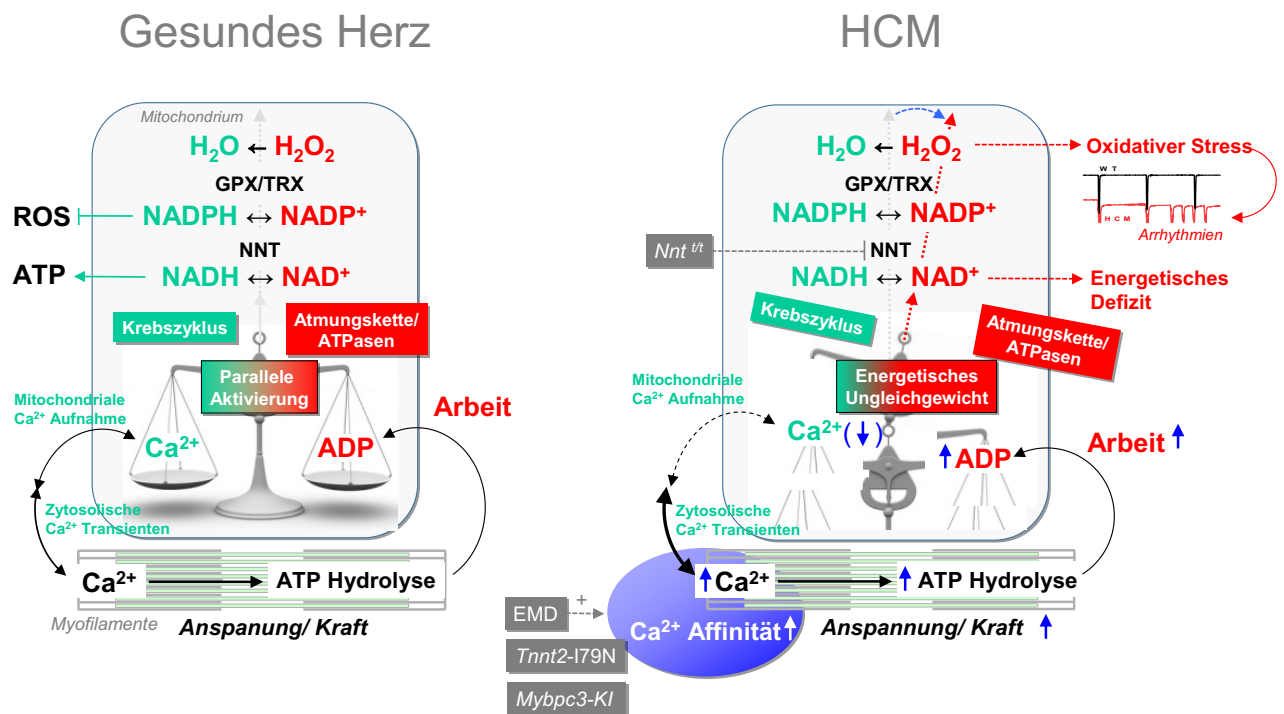


Abbildung 54: Energetisches Gleichgewicht im gesunden Herzen und Imbalance bei HCM. Im gesunden Herzen wird während einer beta-adrenergen Stimulation die ADP-induzierte Oxidation von NADH und NADPH durch Ca²⁺-Stimulation des Citratzyklus adäquat kompensiert. Im Gegensatz dazu kommt es durch eine Mutation im Myosin-bindenden Protein C, wie sie bei Patienten mit HCM auftritt, durch die erhöhte Calcium-Affinität der Myofilamente zu einem Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Ca²⁺-abhängiger Reduktion von NADH und NADPH, was energetisches Defizit und oxidativen Stress verursacht. Simultan hierzu machten wir nach Behandlung mit dem Ca²⁺ Sensitizer EMD oder durch eine im Rückwärtsmodus arbeitende NNT in Tnnt2-I79N-Mäusen vergleichbare Beobachtungen (Kohlhaas et al., 2017).

5.4 Rolle der NNT in HCM

Aufgrund unserer Ergebnisse schlussfolgern wir, dass die NNT die vermehrte NADH-Nachfrage im Falle der HCM primär durch den sogenannten Rückwärtsmodus, der zur gesteigerten Oxidation von NADPH zu NADP führt, zunächst ausgleichen kann. Allerdings verläuft dieser kompensatorische Schritt im Sinne ihrer ambivalenten Funktion gleichzeitig auf Kosten der antioxidativen Kapazität, da NAD(P)H im Umkehrschluss hierfür geringer zur Verfügung steht (Nickel et al., 2015a). Auch in anderen Arbeiten ergaben sich bereits früh im Kontext von erhöhter kardialer Nachlast Beobachtungen, dass die NNT in solch einer

Situation wohl primär im Rückwärtsmodus arbeitet. Die Folge dieses Mechanismus ist der Verlust der entgiftenden Funktion. Konsekutiv kommt es zu vermehrter Emission von ROS, kardialer Nekrose, systolischer Dysfunktion und gesteigerter Mortalität im *in vivo* Model als Reaktion auf eine langfristige kardiale Druck-Überlastung (Nickel et al., 2015a).

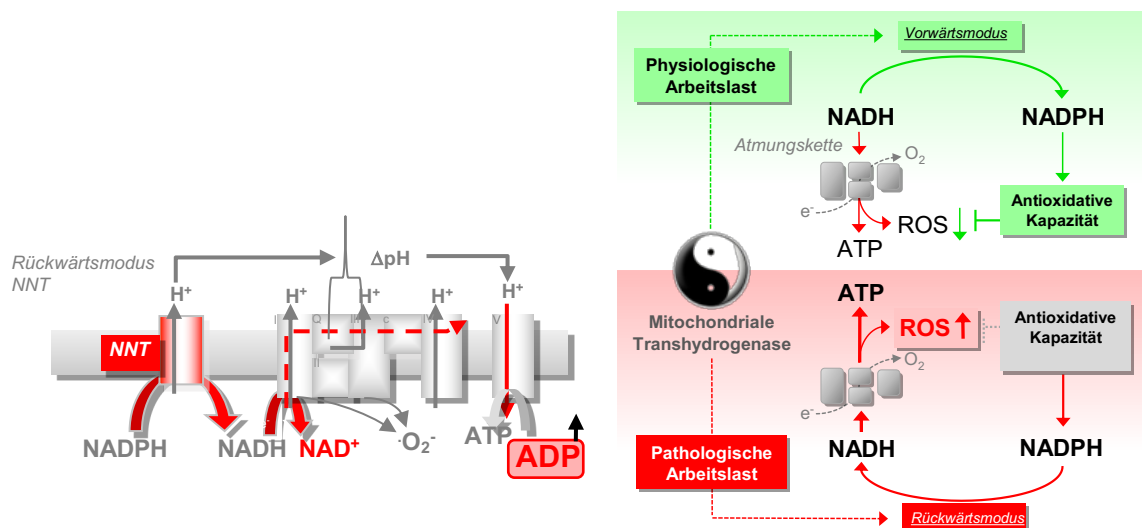


Abbildung 55: Favorisierter Rückwärtsmodus der NNT bei HCM und energetische Auswirkungen des Vorwärts- und des Rückwärtsmodus der NNT unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen (nach Nickel AG, et al. Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure, 2015).

Durch genetische Rekombination zweier Mausstämme mit jeweils einem C57BL/6J Stamm, der die NNT nicht exprimiert (Huang et al., 2006) und einem Tnnt2-I79N-Wildtypstamm, liess man in weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe verschiedene Versuchsgruppen entstehen, die sich folglich entweder homozygot für die Wildtyp Allele (wt/wt), homozygot für die abgeschnittenen NNT Allele (t/t) oder heterozygot für beide (wt/t) entwickelten. Zusammenfassend verhinderte ein Verlust der NNT ROS-Emission und darüber hinaus Arrhythmien in unserem HCM-Model, indem der angenommene Rückwärtsmodus der NNT gar nicht in Kraft treten konnte (Hier nicht dargestellt, Daten ermittelt und ausgewertet durch Frau Olga Otto, AG Maack, Innere Medizin III der Universitätsklinik Homburg).

Dennoch benötigen Myozyten allgemein eine intakt funktionierende NNT, die durch Umkehrung ihrer eigentlichen Funktion (Nickel et al., 2015a) prinzipiell im Stande ist,

NADPH zugunsten der ATP Produktion zu oxidieren (Abbildung 55). Wir durften nichtsdestotrotz festhalten, dass der unter Arbeitslasterrhöhung induzierte Rückwärtsmodus der NNT mit einhergehendem Verbrauch von NADPH einen entscheidenden Mechanismus für die Entstehung von ROS bei HCM darstellen könnte. Hinsichtlich neuer möglicher Therapiezugänge könnten molekulare Veränderungen der NNT eventuell nicht nur die Bildung von Arrhythmien, sondern auch die ungewollte Synthese der reaktiven Sauerstoffspezies bei der HCM positiv beeinflussen. Gleichzeitig erscheint diese Therapieoption wenig sinnvoll, da die NNT in ihrer ursprünglichen Funktion wesentlich antioxidativ wirksam ist und eine entsprechende Funktionsumkehr beispielsweise zu Glukoseintoleranz und auch Diabetes führen kann (Nickel et al., 2015b).

5.5 ROS und Arrhythmien in HCM

NADPH, dessen Vorhandensein normalerweise durch den Citratzyklus sicher gestellt wird, ist unter anderem für die Bereitstellung der mitochondrialen Enzyme Glutathion (GSH) and Thioredoxin (TRX) und damit für die Elimination von H_2O_2 innerhalb der Mitochondrien verantwortlich (Nickel et al., 2014). Analog zu unseren Beobachtungen der gesteigerten NADPH-Oxidation konnten wir auch eine deutlich stärkere Bildung von ROS in den Mybpc3 KI registrieren.

In Übereinstimmung zu bisherigen Arbeiten deuten unsere Daten und die unserer Arbeitsgruppe auf eine ätiologische Verbindung zwischen Veränderungen der myozytären Calciumaffinität, dem mitochondrialen Energiehaushalt und der Bildung von Arrhythmien hin, während das genaue pathophysiologische Zusammenspiel bisher ungeklärt bleibt.

Oxidativer Stress spielt bei vielen diversen Unterformen der Herzinsuffizienz eine ganz zentrale Rolle in der Pathogenese und der Entstehung einer kardialen Dysfunktion (Münzel et al., 2015). In Herzinsuffizienzmodellen des Myokardinfarkts konnten bereits im Rahmen von Ischämie-Reperfusionsschäden die ROS-Freisetzung als eine wesentliche Ursache für ventrikulären Arrhythmien identifiziert werden (Aon et al., 2003; Akar et al., 2005). Zahlreiche Arbeiten konnten darüber hinaus belegen, dass eine mitochondrial-pathophysiologisch erhöhte Bildung von ROS kardiale Arrhythmien kausal auslösen können

(Yang et al., 2015). Allerdings konnte bisher kein übergeordnetes Konzept für die exakten Entstehungsmechanismen von Arrhythmien bei der HCM selbst erarbeitet werden.

Bereits 2005 konnten Nakamura et al. zeigen, dass gerade im Falle der HCM eine starke Korrelation zwischen dem Maß des entstehenden oxidativen Stress und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung existiert (Nakamura et al., 2005b). Eine mögliche Entstehungsursache von Arrhythmien bei HCM könnte eine durch ROS induzierte Oxidation von zytosolischen Ryanodinrezeptoren sein, deren Aktivierung die Freisetzung von Calciumionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol triggert (Xu et al., 1998; Zima and Blatter, 2006). Konsekutiv wird die Calcium ATPase des SR (Flesch et al., 1999; Morris and Sulakhe, 1997; Wagner et al., 2013) durch diesen Mechanismus blockiert und der zytosolische $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher dadurch wiederum vermehrt aktiviert. Infolgedessen kommt es zur Calcium-getriggerten Calciumfreisetzung aus dem SR und Anstieg des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Xu et al., 1998; Zima and Blatter, 2006). Es entsteht eine unregelmäßige Reiz-Weiterleitung und ein durch sogenannte Calcium-bursts zu früh ausgelöstes Aktionspotential. Dadurch kommt es zu einer vulnerableren Erregbarkeit der Ventrikel, da sich Teile des Myokards noch in der Refraktärzeit befinden. Dieses möglicherweise ausgelöste unregelmäßige Aktionspotential kann somit Arrhythmien hervorrufen (Li et al., 2015). Das Zusammenwirken von ROS und Calcium in der Pathogenese der Arrhythmien könnte durch die topographisch enge Nachbarschaft von Mitochondrien zum SR in Kardiomyozyten noch weiter begünstigt werden (Chen et al., 2012; Li et al., 2015). Zudem werden die ROS-getriggerten Pathomechanismen durch zusätzliche Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) scheinbar noch weiter verschlimmert (Erickson et al., 2008; Wagner et al., 2011). Über die erhöhte CaMKII-Aktivität gesteigerte Phosphorylierung zellulärer Natriumkanäle kommt es zur Anhebung des späten Natriumeinstroms ($I_{\text{Na,L}}$) und dadurch zum Anstieg des intrazellulären $[\text{Na}^+]_i$, wie wir es mitunter in unseren Mybpc3-Messungen darlegen konnten. Konsekutiv verlängert sich damit auch das Zeitintervall des dadurch entstehenden Aktionspotentials (Wagner et al., 2006). Grundsätzlich ist diese einerseits durch reaktive Sauerstoffspezies und andererseits durch die CaMKII ausgelöste Aktivierung der L-Typ- Ca^{2+} Kanäle ($I_{\text{Ca,L}}$) im Stande, sowohl verfrühte (EADs) als auch verzögerte Nachdepolarisationen (DAD) und damit grundlegende Entstehungsfaktoren für Arrhythmien zu verursachen (Xie et al., 2009).

Auch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits früh in unseren durchgeführten Messprotokollen feststellen, dass vor allem die Myozyten der Mybpc3 KI insgesamt zu deutlich mehr zu Arrhythmien und genereller Hyperkontraktilität neigten (Flenner et al., 2016). Wir detektierten hierbei das Maß und die Häufigkeit von spontan entstandenen Extrasystolen den Myozyten (Abbildung 56). Unsere Ergebnisse festigten damit die Annahme, dass eine Verschiebung des mitochondrialen Redoxstatus in Richtung Oxidation und die Bildung von ROS im direkten Zusammenhang mit dem Auftreten myozytärer Arrhythmien steht.

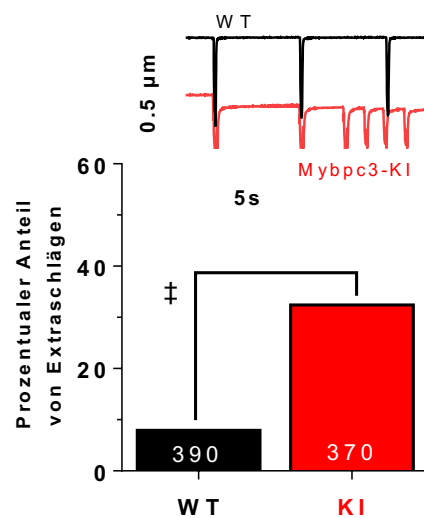


Abbildung 56: Häufigkeitsrate von Arrhythmien zwischen WT und Mybpc3-Knock-In-Myozyten. Bei den WT zählten wir 390, bei den KI 370 einzelne Schläge aus. Innerhalb der Washout Phase nach 5 Hz Stimulation wurde von jeder Myozyte 10 Schläge daraufhin untersucht, ob ihnen eine Extrasystole folgte. n-Zahlen als Myozytenzahlen, WT (n= 39), KI (n= 37). Daten von Herrn Johannes Bay und Frau Olga Otto, AG Maack, Innere Medizin III der Universitätsklinik Homburg erhoben und ausgewertet.

2005 konnten Akar und O'Rourke erstmals eine „metabolic sink“ Hypothese entwickeln, indem sie zeigten, dass oxidativer Stress in Mitochondrien zur mitochondrialen Membrandepolarisation, einer Öffnung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen und zur Entstehung von Reentrytachykardien führte (Akar et al., 2005; O'Rourke et al., 2005; Vakrou and Abraham, 2014). In einem allgemeinen *in vivo* Herzinsuffizienz-Meerschweinchen-Modell konnten Liu et al. unter Arbeitslasterhöhung (Aortenbanding und Isoprenalin) zeigen, dass eine durch CGP-37157 induzierte ROS-Inhibition das Auftreten von kardialer Fibrose und Arrhythmien deutlich reduzierte (Liu et al., 2014).

Um zu evaluieren, ob die beobachteten Mechanismen auch in vollständigen Mäuser Herzen *in vivo* zu vergleichbaren Ergebnissen führen, setzten Knollmann et al. isoliert schlagende Tnnt2-I79N-Herzen innerhalb eines Langendorffsystems einer erhöhten Frequenzstimulation aus. Als Konsequenz entstanden ebenfalls hohe NAD(P)H-Oxidationen und Arrhythmien, die durch CGP-Therapie wiederum verhindert werden konnten. (Hier nicht dargestellt, Daten ermittelt und ausgewertet durch Knollmann et al., Vanderbilt University Medical Center, USA). Um den kausalen Effekt von HCM-Mutationen auf Arrhythmien noch weiter in einem *in vivo* Experiment darzulegen, wurde dem HCM-Knock-In (Tnnt2-I79N) der β -adrenerge Agonist Isoprenalin injiziert. Während die Tnnt2-I79N Mäuse auf die Frequenzanhebung im Vergleich etwas weniger ausgeprägt reagierten, zeigte sich eine deutliche Verlängerung des QRS-Intervalls im Vergleich zu den Tnnt2-Wildtypen (Olga Otto, Promotionsschrift, Homburg 2018). Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass die durch Isoprenalin ausgelöste QRS-Verbreiterung durch eine verminderte longitudinale Leitungsgeschwindigkeit in den Tnnt2-I79N-Myozyten der HCM entsteht, folglich diese auch dadurch eine vermehrte Vulnerabilität für ventrikuläre Tachykardien in sich tragen. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Arbeiten an Tnnt2-I79N Mäusen, bei denen unter erhöhter Frequenzstimulation ebenfalls vermehrte Arrhythmien bei gleichzeitig langsameren Leitungsgeschwindigkeiten festgestellt werden konnte (Huke et al., 2013).

Gleichzeitig konnte im Rahmen anderer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe eine Vorbehandlung der Tnnt2-I79N mit dem ROS-Inhibitor SS-31 die QRS-Verlängerung, aber nicht die Herzfrequenz signifikant im Vergleich zu den Tnnt2-WT reduzieren (Olga Otto, Promotionsschrift, Homburg 2018). Diese Daten verdeutlichen einmal mehr die Rolle von entstehenden ROS bzw. deren Hemmung in der Pathogenese von Arrhythmien und Mortalität in der HCM. Darüber hinaus konnten diese Daten abermals einen direkt-kausalen Zusammenhang von ROS und Arrhythmien bei der HCM unterlegen.

In der Zusammenschau konnte die Behandlung mit SS-31 Störungen des Reizleitungssystems im HCM-Modell merklich vermindern. Indem man die ROS-Emission mit SS-31 bzw. das Gleichgewicht zwischen mitochondrialem Ca^{2+} und ADP durch Behandlung mit dem mNCE-Hemmer CGP in einem balancierten Verhältnis hielt, konnte man Arrhythmien bei den Tnnt2-I79N-signifikant verhindern – ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige HCM-Therapiekonzepte.

5.6 Neue Therapieansatzpunkte der HCM

Bisher konnten sich in der Therapie der symptomatischen HCM Pharmaka, wie β -Blocker (Metoprolol), L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker (Diltiazem, Verapamil), Angiotensin II Rezeptor Antagonisten (Losartan), Antiarrhythmika (Amiodarone), Carnitin-Palmitoyl-Transferase-Inhibitoren (Perhexilin) oder invasive Methoden, wie die chirurgische Myektomie oder die Alkoholablation etablieren (Vakrou and Abraham, 2014). Bisher konnten allerdings keine signifikant lebensverlängernden Effekte einzelner Medikamentengruppen bei HCM nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht das therapeutische Dilemma in der medikamentösen HCM-Therapie. Neue Therapieansätze für die HCM sind entsprechend notwendig, hierzu ist ein umfangreiches Verständnis der Pathomechanismen beginnend von den Genmutationen bis zur Ausprägung des klinischen Phänotyps unabdingbar.

In experimentellen Tiermodellen konnte bisher gezeigt werden, dass eine Verringerung des oxidativen Stress mittels N-Acetylcystein (NAC) mitunter die linksventrikuläre Hypertrophie, Fibrose, diastolische Dysfunktion und nicht zuletzt die vulnerable Anfälligkeit für Arrhythmien deutlich verbessern konnte (Lombardi et al., 2009; Marian et al., 2006). Dabei konnte die Behandlung mit N-Acetylcystein, einem Vorläufer vom antioxidativ wirksamen Glutathion und ein Inhibitor von Mediatoren für zellulären Schaden (Zafarullah et al., 2003), nicht nur die Bildung von oxidativem Stress bis zu 40 % reduzieren, sondern zur Regenerierung von Glutathion und den davon abhängigen kardialen α -Aktin führen (Lombardi et al., 2009). Darüber hinaus konnten die Expressionslevel der Kollagene Colla1 und Colla2 deutlich verringert werden. Interstitielle Fibrose zählt zu den wesentlichen phänotypischen Merkmalen der HCM, eine Vermehrung der kardialen Kollagenkompartimente gilt als früher Marker der Erkrankung (Shirani et al., 2000). Darüber hinaus ist das Ausmaß der strukturellen Hypertrophie ein starker und unabhängiger Prediktor für die Erkrankungsprognose und ein wesentlicher Risikofaktor für primäre ventrikuläre Arrhythmien und den plötzliche Herztod bei jungen Menschen. (Spirito et al., 2000; Varnava et al., 2001). Entsprechend hierzu befindet sich N-Acetylcystein (NAC) inzwischen innerhalb klinischer Studien. (Hypertrophic Regression with N-Acetylcysteine; HALT-HCM, Houston USA; Abbildung 57).

Ein anderer vielversprechender therapeutischer Ansatz der HCM könnte die Reduktion von ROS durch das Tetrapeptid SS-31 sein, das sich derzeit allerdings noch in klinischen Untersuchungen befindet (Szeto, 2014; Abbildung 57). Dai et al. konnten in diesem Zusammenhang sogar einen höheren Benefit der Behandlung mit SS-31 im Vergleich zur NAC in einem Tiermodell mit hypertropher diastolischer Dysfunktion zeigen (Dai et al., 2011).

Sarkomere stellen den zentralen Konzentrationsort von Ca^{2+} dar, mit einem Verhältnis von gebundenem zu freiem Ca^{2+} von 100:1. Es scheint somit realistisch, dass HCM-Mutationen der Sarkomere zu Veränderungen von Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden und letztendlich auch zu Arrhythmien führen (Ashrafian et al., 2011; Semsarian et al., 2002; Vakrou and Abraham, 2014). Vergleichsweise verhindert eine frühe Behandlung mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal Blocker Diltiazem in einem HCM-Mausmodell die Krankheitsentstehung und eine regelrechte Ca^{2+} -Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums (Semsarian et al., 2002). Aber auch auf myofilamentärer Ebene könnten neue reizvolle pharmakologische Ansätze weitere Therapieoptionen schaffen. Das Molekül MYK-461 bewirkt beispielsweise eine verminderte ATPase-Aktivität und dadurch auch eine herunter regulierte Kontraktilität der Myofilamente; im HCM-Mausmodell konnten pathologische Aktin-Myosin Interaktionen durch Behandlung mit diesem Agens wieder behoben werden (Green et al., 2016; Abbildung 57).

Coppini et al. konnten 2012 dementsprechend einen womöglich neuen pharmakologischen Zugang der HCM präsentieren, indem sie Kardiomyozyten von HCM Patienten mit unterschiedlich zu Grunde liegenden Genmutationen untersuchten, die zuvor per therapeutischer Myektomie aus deren Herzen entnommen wurden. In elektrophysiologischen Untersuchungen wiesen die betroffenen Kardiomyozyten zum einen eine Verlängerung des späten Natriumeinstroms $I_{\text{Na,L}}$ und des Calciumeinstroms $I_{\text{Ca,L}}$, eine Verminderung repolarisierender K^+ Ströme, und eine höhere Konzentration von diastolischem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf. Das dadurch entstehende verlängerte Aktionspotential prädisponiert ein vermehrtes Auftreten von Arrhythmien. Zum anderen konnte ebenfalls eine erhöhte CaMKII-Aktivität dargestellt werden, die mit einer gleichzeitig gesteigerten Phosphorylierung der CaMKII-abhängigen Signalkaskaden einhergeht. Eine Behandlung mit Ranolazin, einem Inhibitor des $I_{\text{Na,L}}$, führte zu einem verminderten Vorkommen von verfrühten (EADs) und verzögerten Nachdepolarisationen (DAD) (Coppini et al., 2013). Es gilt dabei nach wie vor als unklar, ob

die erhöhten $[Na^+]_i$ Spiegel entweder grundlegende Auslöser für die Entstehung der HCM sind oder ob durch die Bildung der Hypertrophie erst letztendlich generiert werden (Vakrou and Abraham, 2014).

Nachfolgend konnten Flenner et al. und Lovelock et al. in ihren Arbeiten zeigen, dass Ranolazin in einem Nagetiermodell mit kardialer Hypertrophie die entstandene myofilamentäre Ca^{2+} -Sensitivität reduzieren und die belastungsabhängige diastolische Dysfunktion signifikant verhindern konnte (Flenner et al., 2016; Lovelock et al., 2012). Während erste Studien bereits beendet wurden (RESTYLE-HCM; EUDRA-CT 2011-004507-20, München; Tardiff et al., 2015), bleibt der Effekt von Ranolazin bei HCM Patienten gegenwärtig Bestandteil vieler klinischer Studien. (LIBERTY-HCM-Studie, NCT02291237, USA, Olivotto et al., 2016) und RHYME-Studie, USA, NCT01721967, Gentry et al., 2016). Gegenwärtig konnte allerdings auch bei diesen Substanzen in keiner klinischen HCM-Studie bisher ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (Vakrou and Abraham, 2014).

Die bisher bekannten vielfältigen Mutationen und unterschiedlichen Genotyp-Phänotyp-Verläufe der HCM scheinen mögliche Therapiekonzepte gegenwärtig zu limitieren. Präklinische Untersuchungen müssen die verschiedenen Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung der HCM beitragen, explizit aufzuklären um folglich individualisierte und auf die jeweiligen Mutationen bezogene Therapiekonzepte zu entwickeln.

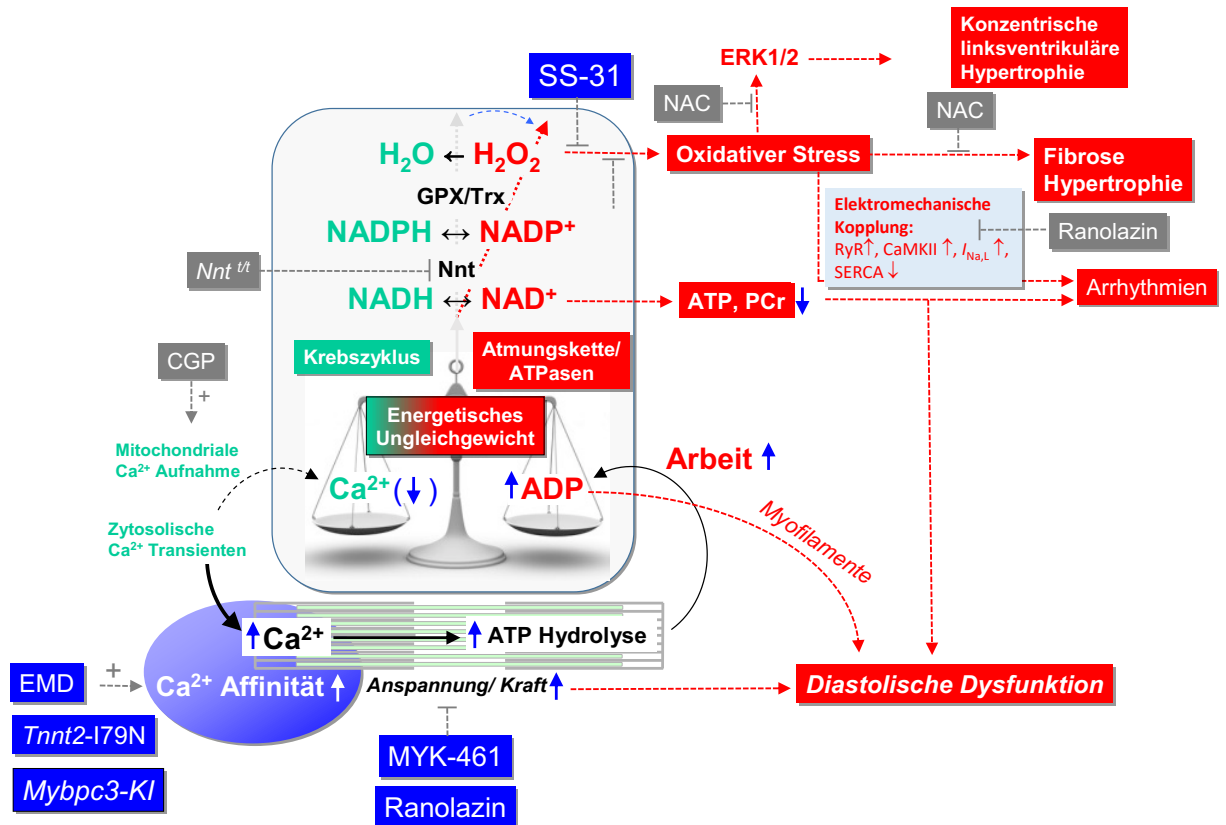


Abbildung 57: Konzept der HCM-Pathogenese mit entstehenden Signalkaskaden und möglichen Therapieansatzpunkten. Durch vermehrte Calcium-Sensitivität der Myofilamente entsteht energetisches Ungleichgewicht. Dies führt über diverse Folgemechanismen zu führt zu oxidativem Stress, konzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie, Fibrose, Arrhythmien und diastolischer Dysfunktion.

CGP, mNCX-Inhibitor CGP-37157; MYK-461, Hemmer der myofilamentären Anspannung; NAC, N-Acetylcystein; NNT, Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase; PCr, Phosphokreatinin; Ranolazin, $I_{\text{Na,L}}$ -Inhibitor; SS-31, ROS-Inhibitor. (Quelle: Arrhythmias in hypertrophic cardiomyopathy are caused by energetic mismatch and mitochondrial reactive oxygen species, Kohlhaas et al., zum Zeitpunkt der Dissertation noch nicht veröffentlicht.)

Unsere Ergebnisse lassen neue Strategien und pharmakologische Lösungsansätze innerhalb der pathophysiologischen Mechanismen der HCM erkennen, mit all den bekannten Elementen der durch Mutationen ausgelösten Störungen der elektromechanischen Kopplung, der energetischen Dysbalance, oxidativem Stress und den schlussendlich auftretenden Arrhythmien. Zu guter Letzt könnten wir an neu identifizierten pharmakologisch-molekularen Zielen ansetzen, um die Mortalitäts-assoziierten Arrhythmien und damit die Langzeitprognose der HCM positiv zu beeinflussen.

Zahlreiche auslösende Mutationen sind für die HCM inzwischen bekannt, die molekularen Mechanismen, die im Endeffekt zu Hypertrophie, Fibrose und ventrikulären Arrhythmien führen, sind bisher nicht vollends verstanden. Bisherige neue myofilamentäre und zelluläre Therapieansätze konnten auch zuletzt keinen wesentlichen Behandlungserfolg erzielen. Neue Studiendesigns an Kardiomyozyten sind daher vonnöten, um die unterschiedlichen Physiologien der Myozyten von Tieren und Menschen zu berücksichtigen. Darüber hinaus gilt es, neue Studienkonzepte womöglich stärker auf die jeweiligen Mutationen der Sarkomere zu beziehen, um die einzelnen pathophysiologischen Entstehungsprozesse noch weiter zu entschlüsseln und damit ein gesamt inkludierendes Gerüst für denkbare Therapiezugänge und möglicherweise molekulare Screening-Verfahren zu erstellen.

Gegenwärtig beschäftigen sich Studien erstmals mit induzierten pluripotenten Stammzellen von HCM Patienten und möglicherweise neuen experimentellen Konzepten. Erste Arbeiten beschäftigten sich bereits mit entnommenen, induzierten Stammzellen aus humanen HCM-Herzen. Hier konnte gezeigt werden, dass die dabei entstandenen Myozyten einen zuverlässigen HCM-Phänotyp darstellen, der eine neue Plattform für neue Therapiestudien bieten könnte (Lan et al., 2013; Vakrou and Abraham, 2014).

5.8 Fazit

Wir schlussfolgern, dass die häufigste beschriebene Mutation der Myofilamente des Myosin-bindenden Protein C nicht nur in einem bioenergetischen Ungleichgewicht, sondern auch in oxidativem Stress im Falle einer β -adrenergen Stimulation resultiert. Im gesunden Herzen wird während einer β -adrenergen Stimulation die ADP-induzierte Oxidation von NADH und NADPH durch Ca^{2+} -Stimulation des Citratzyklus adäquat kompensiert, was das Entstehen von oxidativem Stress verhindert. Durch eine Mutation im Myosin-bindenden Protein C, wie sie bei Patienten mit HCM auftritt, führt erhöhte Calcium-Affinität der Myofilamente zu einem Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Ca^{2+} -abhängiger Reduktion von NADH und NADPH, was auf der einen Seite ein energetisches Defizit und auf der anderen Seite oxidativen Stress verursacht.

Zusammenfassend haben wir ein vereinheitlichendes Konzept etabliert, das energetische Erschöpfung und oxidativen Stress bei HCM und anderen Konstellationen, die mit einer erhöhten Calcium Sensitivität der Myofilamente einhergehen, weitreichend erklärt. Unsere Arbeit konnte darüber hinaus die Entstehung von H_2O_2 als eine auslösende Ursache für die Krankheitsentstehung der HCM identifizieren. Basierend auf unseren Resultaten konnte ein neues Model der HCM-Pathogenese und dessen Signalkaskaden etabliert werden. Die Ergebnisse unserer Arbeit könnten einen möglichen Rahmen schaffen, um neue pharmakologische Ansätze und Strategien auf mitochondrialer Ebene zu entwickeln und bisherige Therapiekonzepte der HCM zur Prävention des plötzlichen Herztods grundlegend zu verändern.

6. Literaturverzeichnis

- Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1140-1149.
- Arad, M., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2002). Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human molecular genetics* 11, 2499-2506.
- Armoundas, A.A., Hobai, I.A., Tomaselli, G.F., Winslow, R.L., and O'Rourke, B. (2003). Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circulation research* 93, 46-53.
- Arteaga, G.M., Palmiter, K.A., Leiden, J.M., and Solaro, R.J. (2000). Attenuation of length dependence of calcium activation in myofilaments of transgenic mouse hearts expressing slow skeletal troponin I. *The Journal of physiology* 526 Pt 3, 541-549.
- Authors/Task Force, m., Elliott, P.M., Anastasakis, A., Borger, M.A., Borggrefe, M., Cecchi, F., Charron, P., Hagege, A.A., Lafont, A., Limongelli, G., Mahrholdt, H., McKenna, W.J., Mogensen, J., Nihoyannopoulos, P., Nistri, S., Pieper, P.G., Pieske, B., Rapezzi, C., Rutten, F.H., Tillmanns, C., and Watkins, H. (2014). 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 35, 2733-2779.
- Balaban, R.S. (2009). The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1334-1341.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Baudenbacher, F., Schober, T., Pinto, J.R., Sidorov, V.Y., Hilliard, F., Solaro, R.J., Potter, J.D., and Knollmann, B.C. (2008). Myofilament Ca²⁺ sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest* 118, 3893-3903.
- Bay, J., Kohlhaas, M., and Maack, C. (2013). Intracellular Na(+) and cardiac metabolism. *Journal of molecular and cellular cardiology* 61, 20-27.
- Bayeva, M., and Ardehali, H. (2010). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage to sarcomeric proteins. *Current hypertension reports* 12, 426-432.
- Belus, A., Piroddi, N., Scellini, B., Tesi, C., D'Amati, G., Girolami, F., Yacoub, M., Cecchi, F., Olivetto, I., and Poggesi, C. (2008). The familial hypertrophic cardiomyopathy-associated myosin mutation R403Q accelerates tension generation and relaxation of human cardiac myofibrils. *The Journal of physiology* 586, 3639-3644.
- Bennett, P.M., Furst, D.O., and Gautel, M. (1999). The C-protein (myosin binding protein C) family: regulators of contraction and sarcomere formation? *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 138, 203-234.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
- Bers, D.M. (2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology* 21, 380-387.
- Bers, D.M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology* 70, 23-49.
- Bonne, G., Carrier, L., Bercovici, J., Cruaud, C., Richard, P., Hainque, B., Gautel, M., Labeit, S., James, M., Beckmann, J., Weissenbach, J., Vosberg, H.P., Fiszman, M., Komajda, M., and Schwartz, K. (1995). Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11, 438-440.

- Bos, J.M., Towbin, J.A., and Ackerman, M.J. (2009). Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 201-211.
- Brand, M.D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology* 45, 466-472.
- Brickson, S., Fitzsimons, D.P., Pereira, L., Hacker, T., Valdivia, H., and Moss, R.L. (2007). In vivo left ventricular functional capacity is compromised in cMyBP-C null mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292, H1747-1754.
- Brown, G.C., and Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 12, 1-4.
- Bugger, H., Chemnitius, J.M., and Doenst, T. (2006). Differential changes in respiratory capacity and ischemia tolerance of isolated mitochondria from atrophied and hypertrophied hearts. *Metabolism: clinical and experimental* 55, 1097-1106.
- Burgoyne, J.R., Mongue-Din, H., Eaton, P., and Shah, A.M. (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circulation research* 111, 1091-1106.
- Carrier, L., Bonne, G., Barend, E., Yu, B., Richard, P., Niel, F., Hainque, B., Cruaud, C., Gary, F., Labeit, S., Bouhour, J.B., Dubourg, O., Desnos, M., Hagege, A.A., Trent, R.J., Komajda, M., Fiszman, M., and Schwartz, K. (1997). Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research* 80, 427-434.
- Carrier, L., Knoll, R., Vignier, N., Keller, D.I., Bausero, P., Prudhon, B., Isnard, R., Ambrosine, M.L., Fiszman, M., Ross, J., Jr., Schwartz, K., and Chien, K.R. (2004). Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovascular research* 63, 293-304.
- Carrier, L., Mearini, G., Stathopoulou, K., and Cuello, F. (2015). Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene* 573, 188-197.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of biological chemistry* 217, 409-427.
- Chen, Y.R., and Zweier, J.L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research* 114, 524-537.
- Cortassa, S., Aon, M.A., O'Rourke, B., Jacques, R., Tseng, H.J., Marban, E., and Winslow, R.L. (2006). A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophysical journal* 91, 1564-1589.
- Cortassa, S., O'Rourke, B., and Aon, M.A. (2014). Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 287-295.
- Craig, R., and Offer, G. (1976). The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 192, 451-461.
- Critoph, C.H., Patel, V., Mist, B., and Elliott, P.M. (2014). Cardiac output response and peripheral oxygen extraction during exercise among symptomatic hypertrophic cardiomyopathy patients with and without left ventricular outflow tract obstruction. *Heart* 100, 639-646.
- Davis, J., Davis, L.C., Correll, R.N., Makarewich, C.A., Schwanekamp, J.A., Moussavi-Harami, F., Wang, D., York, A.J., Wu, H., Houser, S.R., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Regnier, M., Metzger, J.M., Wu, J.C., and Molkentin, J.D. (2016). A Tension-Based Model Distinguishes Hypertrophic versus Dilated Cardiomyopathy. *Cell* 165, 1147-1159.
- Despa, S., and Bers, D.M. (2013). Na(+) transport in the normal and failing heart - remember the balance. *Journal of molecular and cellular cardiology* 61, 2-10.

- Di Domenico, M., Casadonte, R., Ricci, P., Santini, M., Frati, G., Rizzo, A., Carratelli, C.R., Lamberti, M., Parrotta, E., Quaresima, B., Faniello, C.M., Costanzo, F., and Cuda, G. (2012). Cardiac and skeletal muscle expression of mutant beta-myosin heavy chains, degree of functional impairment and phenotypic heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of cellular physiology* 227, 3471-3476.
- Dimitrow, P.P., Undas, A., Bober, M., Tracz, W., and Dubiel, J.S. (2007). Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacological reports* : PR 59, 715-720.
- Dimitrow, P.P., Undas, A., Bober, M., Tracz, W., and Dubiel, J.S. (2008). Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart* 94, e21.
- Dimitrow, P.P., Undas, A., Wołkow, P., Tracz, W., and Dubiel, J.S. (2009). Enhanced oxidative stress in hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacological Reports* 61, 491-495.
- Dixon, L.J., Morgan, D.R., Hughes, S.M., McGrath, L.T., El-Sherbeeney, N.A., Plumb, R.D., Devine, A., Leahey, W., Johnston, G.D., and McVeigh, G.E. (2003). Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. *Circulation* 107, 1725-1728.
- Dorn, G.W., 2nd (2016). Tension-Time Integrals and Genetic Cardiomyopathy: The Force Is with You. *Cell* 165, 1049-1050.
- Elesber, A.A., Best, P.J., Lennon, R.J., Mathew, V., Rihal, C.S., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2006). Plasma 8-iso-prostaglandin F2alpha, a marker of oxidative stress, is increased in patients with acute myocardial infarction. *Free radical research* 40, 385-391.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* 245, C1-14.
- Forbes, J.M., Coughlan, M.T., and Cooper, M.E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57, 1446-1454.
- Frayse, B., Weinberger, F., Bardswell, S.C., Cuello, F., Vignier, N., Geertz, B., Starbatty, J., Kramer, E., Coirault, C., Eschenhagen, T., Kentish, J.C., Avkiran, M., and Carrier, L. (2012). Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52, 1299-1307.
- Frenneaux, M.P., Porter, A., Caforio, A.L., Odawara, H., Counihan, P.J., and McKenna, W.J. (1989). Determinants of exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 1521-1526.
- Frey, N., Luedde, M., and Katus, H.A. (2012). Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 9, 91-100.
- Gauthier, L.D., Greenstein, J.L., Cortassa, S., O'Rourke, B., and Winslow, R.L. (2013). A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria. *Biophysical journal* 105, 1045-1056.
- Gersh, B.J., Maron, B.J., Bonow, R.O., Dearani, J.A., Fifer, M.A., Link, M.S., Naidu, S.S., Nishimura, R.A., Ommen, S.R., Rakowski, H., Seidman, C.E., Towbin, J.A., Udelson, J.E., Yancy, C.W., American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice, G., American Association for Thoracic, S., American Society of, E., American Society of Nuclear, C., Heart Failure Society of, A., Heart Rhythm, S., Society for Cardiovascular, A., Interventions, and Society of Thoracic, S. (2011). 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 124, 2761-2796.

- Glitsch, H.G., and Tappe, A. (1993). The Na⁺/K⁺ pump of cardiac Purkinje cells is preferentially fuelled by glycolytic ATP production. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 422, 380-385.
- Gunter, T.E., and Sheu, S.S. (2009). Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2⁺) transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1291-1308.
- Halдар, S.M., and Srivastava, D. (2016). Sarcomeres and Cardiac Growth: Tension in the Relationship. *Trends in molecular medicine* 22, 530-533.
- Henderson, B.C., Tyagi, N., Ovechkin, A., Kartha, G.K., Moshal, K.S., and Tyagi, S.C. (2007). Oxidative remodeling in pressure overload induced chronic heart failure. *European journal of heart failure* 9, 450-457.
- Ho, C.Y., Sweitzer, N.K., McDonough, B., Maron, B.J., Casey, S.A., Seidman, J.G., Seidman, C.E., and Solomon, S.D. (2002). Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 105, 2992-2997.
- Hool, L.C., Di Maria, C.A., Viola, H.M., and Arthur, P.G. (2005). Role of NAD(P)H oxidase in the regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channel function during acute hypoxia. *Cardiovascular research* 67, 624-635.
- Huang, T.T., Naeemuddin, M., Elchuri, S., Yamaguchi, M., Kozy, H.M., Carlson, E.J., and Epstein, C.J. (2006). Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet* 15, 1187-1194.
- Huke, S., and Knollmann, B.C. (2013). Familial hypertrophic cardiomyopathy: is the Frank-Starling law kaput? *Circulation research* 112, 1409-1411.
- Huke, S., Venkataraman, R., Faggioni, M., Bennuri, S., Hwang, H.S., Baudenbacher, F., and Knollmann, B.C. (2013). Focal energy deprivation underlies arrhythmia susceptibility in mice with calcium-sensitized myofilaments. *Circulation research* 112, 1334-1344.
- Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., Uchida, K., Arimura, K., Egashira, K., and Takeshita, A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circulation research* 85, 357-363.
- Jacob, M.H., Pontes, M.R., Araujo, A.S., Barp, J., Irigoyen, M.C., Llesuy, S.F., Ribeiro, M.F., and Bello-Klein, A. (2006). Aortic-banding induces myocardial oxidative stress and changes in concentration and activity of antioxidants in male Wistar rats. *Life sciences* 79, 2187-2193.
- Javadpour, M.M., Tardiff, J.C., Pinz, I., and Ingwall, J.S. (2003). Decreased energetics in murine hearts bearing the R92Q mutation in cardiac troponin T. *The Journal of clinical investigation* 112, 768-775.
- Jung, W.I., Sieverding, L., Breuer, J., Hoess, T., Widmaier, S., Schmidt, O., Bunse, M., van Erckelens, F., Aplitz, J., Lutz, O., and Dietze, G.J. (1998). ³¹P NMR spectroscopy detects metabolic abnormalities in asymptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 97, 2536-2542.
- Kass, D.A., Hare, J.M., and Georgakopoulos, D. (1998). Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circulation research* 82, 519-522.
- Kim, A., Chen, C.H., Ursell, P., and Huang, T.T. (2010). Genetic modifier of mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice delays heart failure and prolongs survival. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 21, 534-542.
- Kohlhaas, M., Liu, T., Knopp, A., Zeller, T., Ong, M.F., Böhm, M., O'Rourke, B., and Maack, C. (2010). Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 121, 1606-1613.
- Kohlhaas, M., and Maack, C. (2010). Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation* 122, 2273-2280.

- Kohlhaas, M., and Maack, C. (2011). Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends in cardiovascular medicine* 21, 69-73.
- Kohlhaas, M., Nickel, A.G., and Maack, C. (2017). Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of physiology*.
- Kozhevnikova, M.V., Kaplunova, V., Privalova, E.V., Khabarova, N.V., and Belenkov Iu, N. (2014). [Renin-angiotensin-aldosterone system in hypertrophic cardiomyopathy]. *Kardiologiya* 54, 23-28.
- Liebig, M., von Praun, C., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2004). Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiological and biochemical zoology* : PBZ 77, 116-126.
- Liu, T., and O'Rourke, B. (2008). Enhancing mitochondrial Ca^{2+} uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circulation research* 103, 279-288.
- Liu, T., Takimoto, E., Dimaano, V.L., DeMazumder, D., Kettlewell, S., Smith, G., Sidor, A., Abraham, T.P., and O'Rourke, B. (2014). Inhibiting mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange prevents sudden death in a guinea pig model of heart failure. *Circulation research* 115, 44-54.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Luther, P.K., Bennett, P.M., Knupp, C., Craig, R., Padron, R., Harris, S.P., Patel, J., and Moss, R.L. (2008). Understanding the organisation and role of myosin binding protein C in normal striated muscle by comparison with MyBP-C knockout cardiac muscle. *Journal of molecular biology* 384, 60-72.
- Maack, C., Cortassa, S., Aon, M.A., Ganesan, A.N., Liu, T., and O'Rourke, B. (2006). Elevated cytosolic Na^{+} decreases mitochondrial Ca^{2+} uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research* 99, 172-182.
- Maack, C., and O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology* 102, 369-392.
- Maron, B.J., McKenna, W.J., Danielson, G.K., Kappenberger, L.J., Kuhn, H.J., Seidman, C.E., Shah, P.M., Spencer, W.H., 3rd, Spirito, P., Ten Cate, F.J., Wigle, E.D., American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus, D., and European Society of Cardiology Committee for Practice, G. (2003a). American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *European heart journal* 24, 1965-1991.
- Maron, B.J., McKenna, W.J., Danielson, G.K., Kappenberger, L.J., Kuhn, H.J., Seidman, C.E., Shah, P.M., Spencer, W.H., 3rd, Spirito, P., Ten Cate, F.J., Wigle, E.D., Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. American College of, C., and Committee for Practice Guidelines. European Society of, C. (2003b). American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 1687-1713.
- Maron, B.J., Nishimura, R.A., and Danielson, G.K. (1998). Pitfalls in clinical recognition and a novel operative approach for hypertrophic cardiomyopathy with severe outflow obstruction due to anomalous papillary muscle. *Circulation* 98, 2505-2508.

- Maron, B.J., and Roberts, W.C. (1979). Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 59, 689-706.
- Maron, B.J., Shirani, J., Poliac, L.C., Mathenge, R., Roberts, W.C., and Mueller, F.O. (1996). Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA* 276, 199-204.
- Mela, L., and Seitz, S. (1979). Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods in enzymology* 55, 39-46.
- Minta, A., and Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *The Journal of biological chemistry* 264, 19449-19457.
- Minuz, P., Fava, C., and Lechi, A. (2006). Lipid peroxidation, isoprostanes and vascular damage. *Pharmacological reports : PR* 58 Suppl, 57-68.
- Moolman-Smook, J.C., Mayosi, B.M., Brink, P.A., and Corfield, V.A. (2003). Molecular genetics of cardiomyopathy: changing times, shifting paradigms. *Cardiovascular journal of South Africa : official journal for Southern Africa Cardiac Society [and] South African Society of Cardiac Practitioners* 14, 145-155.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Hasko, G., and Pacher, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and biophysical research communications* 358, 203-208.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2007). Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annual review of physiology* 69, 51-67.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.
- Murphy, M.P. (2016). Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochemical Society transactions* 44, 1219-1226.
- Nakamura, K., Kusano, K.F., Matsubara, H., Nakamura, Y., Miura, A., Nishii, N., Banba, K., Nagase, S., Miyaji, K., Morita, H., Saito, H., Emori, T., and Ohe, T. (2005a). Relationship Between Oxidative Stress and Systolic Dysfunction in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure* 11, 117-123.
- Nakamura, K., Kusano, K.F., Matsubara, H., Nakamura, Y., Miura, A., Nishii, N., Banba, K., Nagase, S., Miyaji, K., Morita, H., Saito, H., Emori, T., and Ohe, T. (2005b). Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of cardiac failure* 11, 117-123.
- Nickel, A., Kohlhaas, M., and Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of molecular and cellular cardiology* 73C, 26-33.
- Nickel, A., Loffler, J., and Maack, C. (2013). Myocardial energetics in heart failure. *Basic research in cardiology* 108, 358.
- Nickel, A.G., von Hardenberg, A., Hohl, M., Loffler, J.R., Kohlhaas, M., Becker, J., Reil, J.C., Kazakov, A., Bonnekoh, J., Stadelmaier, M., Puhl, S.L., Wagner, M., Bogeski, I., Cortassa, S., Kappl, R., Pasiaka, B., Lafontaine, M., Lancaster, C.R., Blacker, T.S., Hall, A.R., Duchon, M.R., Kastner, L., Lipp, P., Zeller, T., Muller, C., Knopp, A., Laufs, U., Bohm, M., Hoth, M., and Maack, C. (2015). Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell metabolism* 22, 472-484.
- O'Rourke, B., Kass, D.A., Tomaselli, G.F., Kaab, S., Tunin, R., and Marban, E. (1999). Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circulation research* 84, 562-570.
- Olivotto, I., and Ashley, E.A. (2015). INHERIT (INHibition of the renin angiotensin system in hypertrophic cardiomyopathy and the Effect on hypertrophy-a Randomised Intervention Trial with losartan). *Global cardiology science & practice* 2015, 7.

- Patel, R., Nagueh, S.F., Tsybouleva, N., Abdellatif, M., Lutucuta, S., Kopelen, H.A., Quinones, M.A., Zoghbi, W.A., Entman, M.L., Roberts, R., and Marian, A.J. (2001). Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 104, 317-324.
- Prinz, C., Farr, M., Hering, D., Horstkotte, D., and Faber, L. (2011). The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Deutsches Arzteblatt international* 108, 209-215.
- Rani, B., Kumar, A., Bahl, A., Sharma, R., Prasad, R., and Khullar, M. (2017). Renin-angiotensin system gene polymorphisms as potential modifiers of hypertrophic and dilated cardiomyopathy phenotypes. *Molecular and cellular biochemistry* 427, 1-11.
- Renger, G., and Hanssum, B. (2009). Oxygen detection in biological systems. *Photosynthesis research* 102, 487-498.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews* 86, 369-408.
- Robinson, P., Griffiths, P.J., Watkins, H., and Redwood, C.S. (2007). Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circulation research* 101, 1266-1273.
- Rydstrom, J. (2006). Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 721-726.
- Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., and Colucci, W.S. (2002). Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34, 379-388.
- Schober, T., Huke, S., Venkataraman, R., Gryshchenko, O., Kryshtal, D., Hwang, H.S., Baudenbacher, F.J., and Knollmann, B.C. (2012). Myofilament Ca sensitization increases cytosolic Ca binding affinity, alters intracellular Ca homeostasis, and causes pause-dependent Ca-triggered arrhythmia. *Circulation research* 111, 170-179.
- Scriven, D.R., Dan, P., and Moore, E.D. (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal* 79, 2682-2691.
- Seddon, M., Looi, Y.H., and Shah, A.M. (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93, 903-907.
- Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2011). Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circulation research* 108, 743-750.
- Sequeira, V., Najafi, A., McConnell, M., Fowler, E.D., Bollen, I.A., Wust, R.C., dos Remedios, C., Helmes, M., White, E., Stienen, G.J., Tardiff, J., Kuster, D.W., and van der Velden, J. (2015). Synergistic role of ADP and Ca^{2+} in diastolic myocardial stiffness. *The Journal of physiology* 593, 3899-3916.
- Sequeira, V., Wijnker, P.J., Nijenkamp, L.L., Kuster, D.W., Najafi, A., Witjas-Paalberends, E.R., Regan, J.A., Boontje, N., Ten Cate, F.J., Germans, T., Carrier, L., Sadayappan, S., van Slegtenhorst, M.A., Zaremba, R., Foster, D.B., Murphy, A.M., Poggesi, C., Dos Remedios, C., Stienen, G.J., Ho, C.Y., Michels, M., and van der Velden, J. (2013). Perturbed length-dependent activation in human hypertrophic cardiomyopathy with missense sarcomeric gene mutations. *Circulation research* 112, 1491-1505.
- Smith, G.A., Dixon, H.B., Kirschenlohr, H.L., Grace, A.A., Metcalfe, J.C., and Vandenberg, J.I. (2000). Ca^{2+} buffering in the heart: Ca^{2+} binding to and activation of cardiac myofibrils. *The Biochemical journal* 346 Pt 2, 393-402.
- Spindler, M., Saupe, K.W., Christe, M.E., Sweeney, H.L., Seidman, C.E., Seidman, J.G., and Ingwall, J.S. (1998). Diastolic dysfunction and altered energetics in the $\alpha\text{MHC}403/+$ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 101, 1775-1783.

- Spirito, P., Autore, C., Formisano, F., Assenza, G.E., Biagini, E., Haas, T.S., Bongioanni, S., Semsarian, C., Devoto, E., Musumeci, B., Lai, F., Yeates, L., Conte, M.R., Rapezzi, C., Boni, L., and Maron, B.J. (2014). Risk of sudden death and outcome in patients with hypertrophic cardiomyopathy with benign presentation and without risk factors. *The American journal of cardiology* 113, 1550-1555.
- Starr, R., and Offer, G. (1971). Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS letters* 15, 40-44.
- Szeto, H.H. (2014). First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol* 171, 2029-2050.
- Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J.M., Wolf, C.M., Kim, J.B., Schmitt, J.P., Molkentin, J.D., Norris, R.A., Tager, A.M., Hoffman, S.R., Markwald, R.R., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2010). Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *The Journal of clinical investigation* 120, 3520-3529.
- Terentyev, D., Gyorke, I., Belevych, A.E., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., de Blanco, E.C., Khanna, S., Sen, C.K., Cardounel, A.J., Carnes, C.A., and Gyorke, S. (2008). Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circulation research* 103, 1466-1472.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., and Balaban, R.S. (2000). Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *American journal of physiology. Cell physiology* 278, C423-435.
- Thompson, D.S., Naqvi, N., Juul, S.M., Swanton, R.H., Coltart, D.J., Jenkins, B.S., and Webb-Peploe, M.M. (1980). Effects of propranolol on myocardial oxygen consumption, substrate extraction, and haemodynamics in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *British heart journal* 44, 488-498.
- Torres, J., Darley-USmar, V., and Wilson, M.T. (1995). Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *The Biochemical journal* 312 (Pt 1), 169-173.
- Tsybouleva, N., Zhang, L., Chen, S., Patel, R., Lutucuta, S., Nemoto, S., DeFreitas, G., Entman, M., Carabello, B.A., Roberts, R., and Marian, A.J. (2004). Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 109, 1284-1291.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552, 335-344.
- Turrens, J.F., Alexandre, A., and Lehninger, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 237, 408-414.
- Unno, K., Isobe, S., Izawa, H., Cheng, X.W., Kobayashi, M., Hirashiki, A., Yamada, T., Harada, K., Ohshima, S., Noda, A., Nagata, K., Kato, K., Yokota, M., and Murohara, T. (2009). Relation of functional and morphological changes in mitochondria to myocardial contractile and relaxation reserves in asymptomatic to mildly symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European heart journal* 30, 1853-1862.
- Vakrou, S., and Abraham, M.R. (2014). Hypertrophic cardiomyopathy: a heart in need of an energy bar? *Frontiers in Physiology* 5.
- Vassalle, C., Botto, N., Andreassi, M.G., Berti, S., and Biagini, A. (2003). Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coronary artery disease* 14, 213-218.
- Vignier, N., Schlossarek, S., Fraysse, B., Mearini, G., Kramer, E., Pointu, H., Mougenot, N., Guiard, J., Reimer, R., Hohenberg, H., Schwartz, K., Vernet, M., Eschenhagen, T., and Carrier, L. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system

regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circulation research* 105, 239-248.

Watkins, H., Ashrafian, H., and Redwood, C. (2011). Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 364, 1643-1656.

Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L., Jarcho, J.A., MacRae, C., McKenna, W.J., Maron, B.J., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1995a). Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics* 11, 434-437.

Watkins, H., McKenna, W.J., Thierfelder, L., Suk, H.J., Anan, R., O'Donoghue, A., Spirito, P., Matsumori, A., Moravec, C.S., Seidman, J.G., and et al. (1995b). Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 332, 1058-1064.

Wigle, E.D. (1995). Novel insights into the clinical manifestations and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Current opinion in cardiology* 10, 299-305.

Wilder, T., Ryba, D.M., Wieczorek, D.F., Wolska, B.M., and Solaro, R.J. (2015). N-acetylcysteine reverses diastolic dysfunction and hypertrophy in familial hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 309, H1720-H1730.

Winegrad, S. (1999). Cardiac myosin binding protein C. *Circulation research* 84, 1117-1126.

Witjas-Paalberends, E.R., Ferrara, C., Scellini, B., Piroddi, N., Montag, J., Tesi, C., Stienen, G.J., Michels, M., Ho, C.Y., Kraft, T., Poggesi, C., and van der Velden, J. (2014a). Faster cross-bridge detachment and increased tension cost in human hypertrophic cardiomyopathy with the R403Q MYH7 mutation. *The Journal of physiology* 592, 3257-3272.

Witjas-Paalberends, E.R., Guclu, A., Germans, T., Knaapen, P., Harms, H.J., Vermeer, A.M., Christiaans, I., Wilde, A.A., Dos Remedios, C., Lammertsma, A.A., van Rossum, A.C., Stienen, G.J., van Slegtenhorst, M., Schinkel, A.F., Michels, M., Ho, C.Y., Poggesi, C., and van der Velden, J. (2014b). Gene-specific increase in the energetic cost of contraction in hypertrophic cardiomyopathy caused by thick filament mutations. *Cardiovasc Res* 103, 248-257.

Witt, C.C., Gerull, B., Davies, M.J., Centner, T., Linke, W.A., and Thierfelder, L. (2001). Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. *The Journal of biological chemistry* 276, 5353-5359.

Zhang, M., Perino, A., Ghigo, A., Hirsch, E., and Shah, A.M. (2013). NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? *Antioxidants & redox signaling* 18, 1024-1041.

Zhao, K., Zhao, G.M., Wu, D., Soong, Y., Birk, A.V., Schiller, P.W., and Szeto, H.H. (2004). Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *The Journal of biological chemistry* 279, 34682-34690.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* 94, 909-950.

Abozguia, K., Clarke, K., Lee, L., and Frenneaux, M. (2006). Modification of myocardial substrate use as a therapy for heart failure. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 3, 490-498.

Abozguia, K., Elliott, P., McKenna, W., Phan, T.T., Nallur-Shivu, G., Ahmed, I., Maher, A.R., Kaur, K., Taylor, J., Henning, A., Ashrafian, H., Watkins, H., and Frenneaux, M. (2010). Metabolic modulator perhexiline corrects energy deficiency and improves exercise capacity in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 122, 1562-1569.

Abraham, M.R., Bottomley, P.A., Dimaano, V.L., Pinheiro, A., Steinberg, A., Traill, T.A., Abraham, T.P., and Weiss, R.G. (2013). Creatine kinase adenosine triphosphate and

- phosphocreatine energy supply in a single kindred of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *The American journal of cardiology* 112, 861-866.
- Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1140-1149.
- Akar, F.G., Aon, M.A., Tomaselli, G.F., and O'Rourke, B. (2005). The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest* 115, 3527-3535.
- Aon, M.A., Cortassa, S., Marban, E., and O'Rourke, B. (2003). Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 44735-44744.
- Aon, M.A., Cortassa, S., and O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 865-877.
- Arad, M., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2002). Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human molecular genetics* 11, 2499-2506.
- Armoundas, A.A., Hobai, I.A., Tomaselli, G.F., Winslow, R.L., and O'Rourke, B. (2003). Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circulation research* 93, 46-53.
- Ashrafian, H., Frenneaux, M.P., and Opie, L.H. (2007). Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation* 116, 434-448.
- Ashrafian, H., McKenna, W.J., and Watkins, H. (2011). Disease pathways and novel therapeutic targets in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research* 109, 86-96.
- Ashrafian, H., Redwood, C., Blair, E., and Watkins, H. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends in genetics : TIG* 19, 263-268.
- Authors/Task Force, m., Elliott, P.M., Anastakis, A., Borger, M.A., Borggrefe, M., Cecchi, F., Charron, P., Hagege, A.A., Lafont, A., Limongelli, G., Mahrholdt, H., McKenna, W.J., Mogensen, J., Nihoyannopoulos, P., Nistri, S., Pieper, P.G., Pieske, B., Rapezzi, C., Rutten, F.H., Tillmanns, C., and Watkins, H. (2014). 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 35, 2733-2779.
- Balaban, R.S. (2009). The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1334-1341.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Baudenbacher, F., Schober, T., Pinto, J.R., Sidorov, V.Y., Hilliard, F., Solaro, R.J., Potter, J.D., and Knollmann, B.C. (2008). Myofilament Ca²⁺ sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 3893-3903.
- Bay, J., Kohlhaas, M., and Maack, C. (2013). Intracellular Na(+) and cardiac metabolism. *Journal of molecular and cellular cardiology* 61, 20-27.
- Bayeva, M., and Ardehali, H. (2010). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage to sarcomeric proteins. *Current hypertension reports* 12, 426-432.
- Belus, A., Piroddi, N., Scellini, B., Tesi, C., D'Amati, G., Girolami, F., Yacoub, M., Cecchi, F., Olivetto, I., and Poggesi, C. (2008). The familial hypertrophic cardiomyopathy-associated myosin mutation R403Q accelerates tension generation and relaxation of human cardiac myofibrils. *The Journal of physiology* 586, 3639-3644.
- Bennett, P.M., Furst, D.O., and Gautel, M. (1999). The C-protein (myosin binding protein C) family: regulators of contraction and sarcomere formation? *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 138, 203-234.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.

- Bers, D.M. (2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology* 21, 380-387.
- Bers, D.M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology* 70, 23-49.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I., and Watkins, H. (2001). Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human molecular genetics* 10, 1215-1220.
- Bos, J.M., Towbin, J.A., and Ackerman, M.J. (2009). Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 201-211.
- Brand, M.D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology* 45, 466-472.
- Brickson, S., Fitzsimons, D.P., Pereira, L., Hacker, T., Valdivia, H., and Moss, R.L. (2007). In vivo left ventricular functional capacity is compromised in cMyBP-C null mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292, H1747-1754.
- Brown, G.C., and Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 12, 1-4.
- Bugger, H., Chemnitz, J.M., and Doenst, T. (2006). Differential changes in respiratory capacity and ischemia tolerance of isolated mitochondria from atrophied and hypertrophied hearts. *Metabolism: clinical and experimental* 55, 1097-1106.
- Burgoyne, J.R., Mongue-Din, H., Eaton, P., and Shah, A.M. (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circulation research* 111, 1091-1106.
- Carrier, L., Bonne, G., Bahrend, E., Yu, B., Richard, P., Niel, F., Hainque, B., Cruaud, C., Gary, F., Labeit, S., Bouhour, J.B., Dubourg, O., Desnos, M., Hagege, A.A., Trent, R.J., Komajda, M., Fiszman, M., and Schwartz, K. (1997). Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research* 80, 427-434.
- Carrier, L., Knoll, R., Vignier, N., Keller, D.I., Bausero, P., Prudhon, B., Isnard, R., Ambrosine, M.L., Fiszman, M., Ross, J., Jr., Schwartz, K., and Chien, K.R. (2004). Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovascular research* 63, 293-304.
- Carrier, L., Mearini, G., Stathopoulou, K., and Cuello, F. (2015). Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene* 573, 188-197.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of biological chemistry* 217, 409-427.
- Chen, Y., Csordas, G., Jowdy, C., Schneider, T.G., Csordas, N., Wang, W., Liu, Y., Kohlhaas, M., Meiser, M., Bergem, S., Nerbonne, J.M., Dorn, G.W., 2nd, and Maack, C. (2012). Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk. *Circulation research* 111, 863-875.
- Chen, Y.R., and Zweier, J.L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research* 114, 524-537.
- Christiansen, L.B., Dela, F., Koch, J., Hansen, C.N., Leifsson, P.S., and Yokota, T. (2015). Impaired cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation and enhanced mitochondrial oxidative stress in feline hypertrophic cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 308, H1237-1247.

- Coppini, R., Ferrantini, C., Yao, L., Fan, P., Del Lungo, M., Stillitano, F., Sartiani, L., Tosi, B., Suffredini, S., Tesi, C., Yacoub, M., Olivotto, I., Belardinelli, L., Poggesi, C., Cerbai, E., and Mugelli, A. (2013). Late Sodium Current Inhibition Reverses Electromechanical Dysfunction in Human Hypertrophic Cardiomyopathy Clinical Perspective. *Circulation* 127, 575-584.
- Cortassa, S., Aon, M.A., O'Rourke, B., Jacques, R., Tseng, H.J., Marban, E., and Winslow, R.L. (2006). A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophysical journal* 91, 1564-1589.
- Cortassa, S., O'Rourke, B., and Aon, M.A. (2014). Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 287-295.
- Craig, R., and Offer, G. (1976). The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 192, 451-461.
- Crilly, J.G., Boehm, E.A., Blair, E., Rajagopalan, B., Blamire, A.M., Styles, P., McKenna, W.J., Ostman-Smith, I., Clarke, K., and Watkins, H. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 41, 1776-1782.
- Critoph, C.H., Patel, V., Mist, B., and Elliott, P.M. (2014). Cardiac output response and peripheral oxygen extraction during exercise among symptomatic hypertrophic cardiomyopathy patients with and without left ventricular outflow tract obstruction. *Heart* 100, 639-646.
- Dai, D.F., Chen, T., Szeto, H., Nieves-Cintrón, M., Kutayav, V., Santana, L.F., and Rabinovitch, P.S. (2011). Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 58, 73-82.
- Davis, J., Davis, L.C., Correll, R.N., Makarewich, C.A., Schwanekamp, J.A., Moussavi-Harami, F., Wang, D., York, A.J., Wu, H., Houser, S.R., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Regnier, M., Metzger, J.M., Wu, J.C., and Molkentin, J.D. (2016). A Tension-Based Model Distinguishes Hypertrophic versus Dilated Cardiomyopathy. *Cell* 165, 1147-1159.
- Despa, S., and Bers, D.M. (2013). Na⁽⁺⁾ transport in the normal and failing heart - remember the balance. *Journal of molecular and cellular cardiology* 61, 2-10.
- Dimitrow, P.P., Undas, A., Bober, M., Tracz, W., and Dubiel, J.S. (2007). Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacological reports* : PR 59, 715-720.
- Dimitrow, P.P., Undas, A., Bober, M., Tracz, W., and Dubiel, J.S. (2008). Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart* 94, e21.
- Dimitrow, P.P., Undas, A., Wołkow, P., Tracz, W., and Dubiel, J.S. (2009). Enhanced oxidative stress in hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacological Reports* 61, 491-495.
- Dixon, L.J., Morgan, D.R., Hughes, S.M., McGrath, L.T., El-Sherbeeney, N.A., Plumb, R.D., Devine, A., Leahey, W., Johnston, G.D., and McVeigh, G.E. (2003). Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. *Circulation* 107, 1725-1728.
- Dorn, G.W., 2nd (2016). Tension-Time Integrals and Genetic Cardiomyopathy: The Force Is with You. *Cell* 165, 1049-1050.
- Elesber, A.A., Best, P.J., Lennon, R.J., Mathew, V., Rihal, C.S., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2006). Plasma 8-iso-prostaglandin F₂α, a marker of oxidative stress, is increased in patients with acute myocardial infarction. *Free radical research* 40, 385-391.
- Erickson, J.R., Joiner, M.L., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M.C., Zimmerman, K., Ham, A.J., Weiss, R.M., Spitz, D.R., Shea, M.A., Colbran, R.J., Mohler, P.J., and Anderson, M.E.

- (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462-474.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* 245, C1-14.
- Flenner, F., Friedrich, F.W., Ungeheuer, N., Christ, T., Geertz, B., Reischmann, S., Wagner, S., Stathopoulou, K., Sohren, K.D., Weinberger, F., Schwedhelm, E., Cuello, F., Maier, L.S., Eschenhagen, T., and Carrier, L. (2016). Ranolazine antagonizes catecholamine-induced dysfunction in isolated cardiomyocytes, but lacks long-term therapeutic effects in vivo in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular research* 109, 90-102.
- Flesch, M., Maack, C., Cremers, B., Bäumer, A.T., Südkamp, M., and Böhm, M. (1999). Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation* 100, 346-353.
- Forbes, J.M., Coughlan, M.T., and Cooper, M.E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57, 1446-1454.
- Frayse, B., Weinberger, F., Bardswell, S.C., Cuello, F., Vignier, N., Geertz, B., Starbatty, J., Kramer, E., Coirault, C., Eschenhagen, T., Kentish, J.C., Avkiran, M., and Carrier, L. (2012). Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52, 1299-1307.
- Frenneaux, M.P., Porter, A., Caforio, A.L., Odawara, H., Counihan, P.J., and McKenna, W.J. (1989). Determinants of exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 1521-1526.
- Frey, N., Luedde, M., and Katus, H.A. (2012). Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 9, 91-100.
- Gauthier, L.D., Greenstein, J.L., Cortassa, S., O'Rourke, B., and Winslow, R.L. (2013). A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria. *Biophysical journal* 105, 1045-1056.
- Gentry, J.L., 3rd, Mentz, R.J., Hurdle, M., and Wang, A. (2016). Ranolazine for Treatment of Angina or Dyspnea in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients (RHYME). *Journal of the American College of Cardiology* 68, 1815-1817.
- Gersh, B.J., Maron, B.J., Bonow, R.O., Dearani, J.A., Fifer, M.A., Link, M.S., Naidu, S.S., Nishimura, R.A., Ommen, S.R., Rakowski, H., Seidman, C.E., Towbin, J.A., Udelson, J.E., Yancy, C.W., American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice, G., American Association for Thoracic, S., American Society of, E., American Society of Nuclear, C., Heart Failure Society of, A., Heart Rhythm, S., Society for Cardiovascular, A., Interventions, and Society of Thoracic, S. (2011). 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 124, 2761-2796.
- Glitsch, H.G., and Tappe, A. (1993). The Na⁺/K⁺ pump of cardiac Purkinje cells is preferentially fuelled by glycolytic ATP production. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 422, 380-385.
- Green, E.M., Wakimoto, H., Anderson, R.L., Evanchik, M.J., Gorham, J.M., Harrison, B.C., Henze, M., Kawas, R., Oslob, J.D., Rodriguez, H.M., Song, Y., Wan, W., Leinwand, L.A., Spudich, J.A., McDowell, R.S., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2016). A small-molecule inhibitor of sarcomere contractility suppresses hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Science* 351, 617-621.
- Gunter, T.E., and Sheu, S.S. (2009). Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1291-1308.

- Haldar, S.M., and Srivastava, D. (2016). Sarcomeres and Cardiac Growth: Tension in the Relationship. *Trends in molecular medicine* 22, 530-533.
- Halestrap, A.P., and Richardson, A.P. (2015). The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* 78, 129-141.
- Harris, S.P., Bartley, C.R., Hacker, T.A., McDonald, K.S., Douglas, P.S., Greaser, M.L., Powers, P.A., and Moss, R.L. (2002). Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circulation research* 90, 594-601.
- Henderson, B.C., Tyagi, N., Ovechkin, A., Kartha, G.K., Moshal, K.S., and Tyagi, S.C. (2007). Oxidative remodeling in pressure overload induced chronic heart failure. *European journal of heart failure* 9, 450-457.
- Ho, C.Y., Sweitzer, N.K., McDonough, B., Maron, B.J., Casey, S.A., Seidman, J.G., Seidman, C.E., and Solomon, S.D. (2002). Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 105, 2992-2997.
- Hool, L.C., Di Maria, C.A., Viola, H.M., and Arthur, P.G. (2005). Role of NAD(P)H oxidase in the regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channel function during acute hypoxia. *Cardiovascular research* 67, 624-635.
- Huang, T.T., Naemuddin, M., Elchuri, S., Yamaguchi, M., Kozy, H.M., Carlson, E.J., and Epstein, C.J. (2006). Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet* 15, 1187-1194.
- Huke, S., and Knollmann, B.C. (2013). Familial hypertrophic cardiomyopathy: is the Frank-Starling law kaput? *Circulation research* 112, 1409-1411.
- Huke, S., Venkataraman, R., Faggioni, M., Bennuri, S., Hwang, H.S., Baudenbacher, F., and Knollmann, B.C. (2013). Focal energy deprivation underlies arrhythmia susceptibility in mice with calcium-sensitized myofilaments. *Circulation research* 112, 1334-1344.
- Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., Uchida, K., Arimura, K., Egashira, K., and Takeshita, A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circulation research* 85, 357-363.
- Ingwall, J.S. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular research* 81, 412-419.
- Jacob, M.H., Pontes, M.R., Araujo, A.S., Barp, J., Irigoyen, M.C., Llesuy, S.F., Ribeiro, M.F., and Bello-Klein, A. (2006). Aortic-banding induces myocardial oxidative stress and changes in concentration and activity of antioxidants in male Wistar rats. *Life sciences* 79, 2187-2193.
- Javadpour, M.M., Tardiff, J.C., Pinz, I., and Ingwall, J.S. Decreased energetics in murine hearts bearing the R92Q mutation in cardiac troponin T. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 768-775.
- Javadpour, M.M., Tardiff, J.C., Pinz, I., and Ingwall, J.S. (2003). Decreased energetics in murine hearts bearing the R92Q mutation in cardiac troponin T. *The Journal of clinical investigation* 112, 768-775.
- Jung, W.I., Sieverding, L., Breuer, J., Hoess, T., Widmaier, S., Schmidt, O., Bunse, M., van Erckelens, F., Aplitz, J., Lutz, O., and Dietze, G.J. (1998). ^{31}P NMR spectroscopy detects metabolic abnormalities in asymptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 97, 2536-2542.
- Kass, D.A., Hare, J.M., and Georgakopoulos, D. (1998). Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circulation research* 82, 519-522.
- Kim, A., Chen, C.H., Ursell, P., and Huang, T.T. (2010). Genetic modifier of mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice delays heart failure and prolongs survival. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 21, 534-542.

- Knollmann, B.C., Blatt, S.A., Horton, K., de Freitas, F., Miller, T., Bell, M., Housmans, P.R., Weissman, N.J., Morad, M., and Potter, J.D. (2001). Inotropic stimulation induces cardiac dysfunction in transgenic mice expressing a troponin T (I79N) mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of biological chemistry* 276, 10039-10048.
- Kohlhaas, M., Liu, T., Knopp, A., Zeller, T., Ong, M.F., Bohm, M., O'Rourke, B., and Maack, C. (2010). Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 121, 1606-1613.
- Kohlhaas, M., and Maack, C. (2010). Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation* 122, 2273-2280.
- Kohlhaas, M., and Maack, C. (2011). Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends in cardiovascular medicine* 21, 69-73.
- Kohlhaas, M., Nickel, A.G., and Maack, C. (2017). Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of physiology*.
- Kozhevnikova, M.V., Kaplunova, V., Privalova, E.V., Khabarova, N.V., and Belenkov Iu, N. (2014). [Renin-angiotensin-aldosterone system in hypertrophic cardiomyopathy]. *Kardiologiia* 54, 23-28.
- Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., Han, L., Yen, M., Wang, Y., Sun, N., Abilez, O.J., Hu, S., Ebert, A.D., Navarrete, E.G., Simmons, C.S., Wheeler, M., Pruitt, B., Lewis, R., Yamaguchi, Y., Ashley, E.A., Bers, D.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., and Wu, J.C. (2013). Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 12, 101-113.
- Li, Q., Su, D., O'Rourke, B., Pogwizd, S.M., and Zhou, L. (2015). Mitochondria-derived ROS bursts disturb Ca²⁺(+) cycling and induce abnormal automaticity in guinea pig cardiomyocytes: a theoretical study. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 308, H623-636.
- Liebig, M., von Praun, C., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2004). Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiological and biochemical zoology : PBZ* 77, 116-126.
- Liu, T., and O'Rourke, B. (2008). Enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circulation research* 103, 279-288.
- Liu, T., Takimoto, E., Dimaano, V.L., DeMazumder, D., Kettlewell, S., Smith, G., Sidor, A., Abraham, T.P., and O'Rourke, B. (2014). Inhibiting mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange prevents sudden death in a guinea pig model of heart failure. *Circulation research* 115, 44-54.
- Lombardi, R., Rodriguez, G., Chen, S.N., Ripplinger, C.M., Li, W., Chen, J., Willerson, J.T., Betocchi, S., Wickline, S.A., Efimov, I.R., and Marian, A.J. (2009). Resolution of Established Cardiac Hypertrophy and Fibrosis and Prevention of Systolic Dysfunction in a Transgenic Rabbit Model of Human Cardiomyopathy Through Thiol-Sensitive Mechanisms. *Circulation* 119, 1398-1407.
- Lovelock, J.D., Monasky, M.M., Jeong, E.M., Lardin, H.A., Liu, H., Patel, B.G., Taglieri, D.M., Gu, L., Kumar, P., Pokhrel, N., Zeng, D., Belardinelli, L., Sorescu, D., Solaro, R.J., and Dudley, S.C., Jr. (2012). Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circulation research* 110, 841-850.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Lucas, D.T., Aryal, P., Szweda, L.I., Koch, W.J., and Leinwand, L.A. (2003). Alterations in mitochondrial function in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284, H575-583.

- Luther, P.K., Bennett, P.M., Knupp, C., Craig, R., Padron, R., Harris, S.P., Patel, J., and Moss, R.L. (2008). Understanding the organisation and role of myosin binding protein C in normal striated muscle by comparison with MyBP-C knockout cardiac muscle. *Journal of molecular biology* 384, 60-72.
- Maack, C., Cortassa, S., Aon, M.A., Ganesan, A.N., Liu, T., and O'Rourke, B. (2006). Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research* 99, 172-182.
- Maack, C., and O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology* 102, 369-392.
- Marian, A.J., Senthil, V., Chen, S.N., and Lombardi, R. (2006). Antifibrotic Effects of Antioxidant N-Acetylcysteine in a Mouse Model of Human Hypertrophic Cardiomyopathy Mutation. *Journal of the American College of Cardiology* 47, 827-834.
- Maron, B.J., McKenna, W.J., Danielson, G.K., Kappenberger, L.J., Kuhn, H.J., Seidman, C.E., Shah, P.M., Spencer, W.H., 3rd, Spirito, P., Ten Cate, F.J., Wigle, E.D., American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus, D., and European Society of Cardiology Committee for Practice, G. (2003a). American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *European heart journal* 24, 1965-1991.
- Maron, B.J., McKenna, W.J., Danielson, G.K., Kappenberger, L.J., Kuhn, H.J., Seidman, C.E., Shah, P.M., Spencer, W.H., 3rd, Spirito, P., Ten Cate, F.J., Wigle, E.D., Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. American College of, C., and Committee for Practice Guidelines. European Society of, C. (2003b). American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 1687-1713.
- Maron, B.J., Nishimura, R.A., and Danielson, G.K. (1998). Pitfalls in clinical recognition and a novel operative approach for hypertrophic cardiomyopathy with severe outflow obstruction due to anomalous papillary muscle. *Circulation* 98, 2505-2508.
- Maron, B.J., and Roberts, W.C. (1979). Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 59, 689-706.
- Maron, B.J., Shirani, J., Poliac, L.C., Mathenge, R., Roberts, W.C., and Mueller, F.O. (1996). Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Jama* 276, 199-204.
- Mela, L., and Seitz, S. (1979). Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods in enzymology* 55, 39-46.
- Meyer, S., Franz, A.R., Bay, J., and Gortner, L. (2017a). Short-, medium-, and long-term assessment of pulmonary dysfunction in extremely low birth weight neonates. *The Journal of pediatrics* 189, 240-241.
- Meyer, S., Franz, A.R., Bay, J., Gortner, L., and NeoVita, A.S.G. (2017b). Developing a better and practical definition of bronchopulmonary dysplasia. *Acta paediatrica* 106, 842.
- Meyer, S., Gortner, L., and NeoVita, A.T.I. (2014). Early postnatal additional high-dose oral vitamin A supplementation versus placebo for 28 days for preventing bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Neonatology* 105, 182-188.

- Meyer, S., Gortner, L., and NeoVita, A.T.i. (2017c). Up-date on the NeoVitaA Trial: Obstacles, challenges, perspectives, and local experiences. *Wiener medizinische Wochenschrift* 167, 264-270.
- Meyer, S., Rohr, S., Duppre, P., Bay, J., Gortner, L., and Poryo, M. (2016). Neonatal thrombosis: Etiology and associated risk factors. *The Journal of pediatrics* 175, 242-243.
- Minta, A., and Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *The Journal of biological chemistry* 264, 19449-19457.
- Minuz, P., Fava, C., and Lechi, A. (2006). Lipid peroxidation, isoprostanes and vascular damage. *Pharmacological reports : PR* 58 Suppl, 57-68.
- Moolman-Smook, J.C., Mayosi, B.M., Brink, P.A., and Corfield, V.A. (2003). Molecular genetics of cardiomyopathy: changing times, shifting paradigms. *Cardiovascular journal of South Africa : official journal for Southern Africa Cardiac Society [and] South African Society of Cardiac Practitioners* 14, 145-155.
- Morris, T.E., and Sulakhe, P.V. (1997). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 22, 37-47.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Hasko, G., and Pacher, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and biophysical research communications* 358, 203-208.
- Münzel, T., Gori, T., Keaney, J.F., Jr., Maack, C., and Daiber, A. (2015). Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J* 36, 2555-2564.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2007). Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annual review of physiology* 69, 51-67.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.
- Murphy, M.P. (2016). Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochemical Society transactions* 44, 1219-1226.
- Nakamura, K., Kusano, K.F., Matsubara, H., Nakamura, Y., Miura, A., Nishii, N., Banba, K., Nagase, S., Miyaji, K., Morita, H., Saito, H., Emori, T., and Ohe, T. (2005a). Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of cardiac failure* 11, 117-123.
- Nakamura, K., Kusano, K.F., Matsubara, H., Nakamura, Y., Miura, A., Nishii, N., Banba, K., Nagase, S., Miyaji, K., Morita, H., Saito, H., Emori, T., and Ohe, T. (2005b). Relationship Between Oxidative Stress and Systolic Dysfunction in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of cardiac failure* 11, 117-123.
- Neely, J.R., Rovetto, M.J., and Oram, J.F. (1972). Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Progress in cardiovascular diseases* 15, 289-329.
- Nickel, A., Kohlhaas, M., and Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of molecular and cellular cardiology* 73, 26-33.
- Nickel, A., Löffler, J., and Maack, C. (2013). Myocardial energetics in heart failure. *Basic research in cardiology* 108, 358.
- Nickel, A.G., von Hardenberg, A., Hohl, M., Löffler, J.R., Kohlhaas, M., Becker, J., Reil, J.C., Kazakov, A., Bonnekoh, J., Stadelmaier, M., Puhl, S.L., Wagner, M., Bogeski, I., Cortassa, S., Kappl, R., Pasiëka, B., Lafontaine, M., Lancaster, C.R., Blacker, T.S., Hall, A.R., Duchon, M.R., Kaestner, L., Lipp, P., Zeller, T., Müller, C., Knopp, A., Laufs, U., Böhm, M., Hoth, M., and Maack, C. (2015a). Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metab* 22, 472-484.
- Nickel, A.G., von Hardenberg, A., Hohl, M., Löffler, J.R., Kohlhaas, M., Becker, J., Reil, J.C., Kazakov, A., Bonnekoh, J., Stadelmaier, M., Puhl, S.L., Wagner, M., Bogeski, I., Cortassa, S., Kappl, R., Pasiëka, B., Lafontaine, M., Lancaster, C.R., Blacker, T.S., Hall,

- A.R., Duchen, M.R., Kastner, L., Lipp, P., Zeller, T., Muller, C., Knopp, A., Laufs, U., Bohm, M., Hoth, M., and Maack, C. (2015b). Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell metabolism* 22, 472-484.
- O'Rourke, B., Cortassa, S., and Aon, M.A. (2005). Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology* 20, 303-315.
- O'Rourke, B., Kass, D.A., Tomaselli, G.F., Kaab, S., Tunin, R., and Marban, E. (1999). Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circulation research* 84, 562-570.
- Okizaki, A., Shuke, N., Sato, J., Sasaki, T., Hasebe, N., Kikuchi, K., and Aburano, T. (2007). A compartment model analysis for investigation of myocardial fatty acid metabolism in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Nuclear medicine communications* 28, 726-735.
- Olivotto, I., and Ashley, E.A. (2015). INHERIT (INHibition of the renin angiotensin system in hypertrophic cardiomyopathy and the Effect on hypertrophy-a Randomised Intervention Trial with losartan). *Global cardiology science & practice* 2015, 7.
- Olivotto, I., Hellawell, J.L., Farzaneh-Far, R., Blair, C., Coppini, R., Myers, J., Belardinelli, L., and Maron, M.S. (2016). Novel Approach Targeting the Complex Pathophysiology of Hypertrophic Cardiomyopathy: The Impact of Late Sodium Current Inhibition on Exercise Capacity in Subjects with Symptomatic Hypertrophic Cardiomyopathy (LIBERTY-HCM) Trial. *Circ Heart Fail* 9, e002764.
- Patel, R., Nagueh, S.F., Tsybouleva, N., Abdellatif, M., Lutucuta, S., Kopelen, H.A., Quinones, M.A., Zoghbi, W.A., Entman, M.L., Roberts, R., and Marian, A.J. (2001). Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 104, 317-324.
- Prinz, C., Farr, M., Hering, D., Horstkotte, D., and Faber, L. (2011). The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Deutsches Arzteblatt international* 108, 209-215.
- Rani, B., Kumar, A., Bahl, A., Sharma, R., Prasad, R., and Khullar, M. (2017). Renin-angiotensin system gene polymorphisms as potential modifiers of hypertrophic and dilated cardiomyopathy phenotypes. *Molecular and cellular biochemistry* 427, 1-11.
- Renger, G., and Hanssum, B. (2009). Oxygen detection in biological systems. *Photosynthesis research* 102, 487-498.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews* 86, 369-408.
- Robinson, P., Griffiths, P.J., Watkins, H., and Redwood, C.S. (2007). Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circulation research* 101, 1266-1273.
- Rohr, M., Poryo, M., Bay, J., Gortner, L., and Meyer, S. (2017). Episodes of hypo- and hypercapnia in a cohort of mechanically ventilated VLBW infants: the role of adequate staffing. *Wiener medizinische Wochenschrift* 167, 256-258.
- Rydstrom, J. (2006). Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 721-726.
- Saks, V., Dzeja, P., Schlattner, U., Vendelin, M., Terzic, A., and Wallimann, T. (2006). Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *The Journal of physiology* 571, 253-273.
- Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., and Colucci, W.S. (2002). Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34, 379-388.
- Schober, T., Huke, S., Venkataraman, R., Gryshchenko, O., Kryshchal, D., Hwang, H.S., Baudenbacher, F.J., and Knollmann, B.C. (2012). Myofilament Ca sensitization increases

- cytosolic Ca binding affinity, alters intracellular Ca homeostasis, and causes pause-dependent Ca-triggered arrhythmia. *Circulation research* 111, 170-179.
- Scriven, D.R., Dan, P., and Moore, E.D. (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal* 79, 2682-2691.
- Seddon, M., Looi, Y.H., and Shah, A.M. (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93, 903-907.
- Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2011). Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circulation research* 108, 743-750.
- Semsarian, C., Ahmad, I., Giewat, M., Georgakopoulos, D., Schmitt, J.P., McConnell, B.K., Reiken, S., Mende, U., Marks, A.R., Kass, D.A., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2002). The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *The Journal of clinical investigation* 109, 1013-1020.
- Sequeira, V., Najafi, A., McConnell, M., Fowler, E.D., Bollen, I.A., Wust, R.C., dos Remedios, C., Helmes, M., White, E., Stienen, G.J., Tardiff, J., Kuster, D.W., and van der Velden, J. (2015a). Synergistic role of ADP and Ca(2+) in diastolic myocardial stiffness. *The Journal of physiology* 593, 3899-3916.
- Sequeira, V., Najafi, A., Wijnker, P.J., Dos Remedios, C.G., Michels, M., Kuster, D.W., and van der Velden, J. (2015b). ADP-stimulated contraction: A predictor of thin-filament activation in cardiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E7003-7012.
- Sequeira, V., Wijnker, P.J., Nienkamp, L.L., Kuster, D.W., Najafi, A., Witjas-Paalberends, E.R., Regan, J.A., Boontje, N., Ten Cate, F.J., Germans, T., Carrier, L., Sadayappan, S., van Slegtenhorst, M.A., Zaremba, R., Foster, D.B., Murphy, A.M., Poggesi, C., Dos Remedios, C., Stienen, G.J., Ho, C.Y., Michels, M., and van der Velden, J. (2013). Perturbed length-dependent activation in human hypertrophic cardiomyopathy with missense sarcomeric gene mutations. *Circulation research* 112, 1491-1505.
- Shirani, J., Pick, R., Roberts, W.C., and Maron, B.J. (2000). Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Journal of the American College of Cardiology* 35, 36-44.
- Smith, G.A., Dixon, H.B., Kirschenlohr, H.L., Grace, A.A., Metcalfe, J.C., and Vandenberg, J.I. (2000). Ca²⁺ buffering in the heart: Ca²⁺ binding to and activation of cardiac myofibrils. *The Biochemical journal* 346 Pt 2, 393-402.
- Spindler, M., Saupe, K.W., Christe, M.E., Sweeney, H.L., Seidman, C.E., Seidman, J.G., and Ingwall, J.S. (1998). Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* 101, 1775-1783.
- Spirito, P., Autore, C., Formisano, F., Assenza, G.E., Biagini, E., Haas, T.S., Bongioanni, S., Semsarian, C., Devoto, E., Musumeci, B., Lai, F., Yeates, L., Conte, M.R., Rapezzi, C., Boni, L., and Maron, B.J. (2014). Risk of sudden death and outcome in patients with hypertrophic cardiomyopathy with benign presentation and without risk factors. *The American journal of cardiology* 113, 1550-1555.
- Spirito, P., Bellone, P., Harris, K.M., Bernabo, P., Bruzzi, P., and Maron, B.J. (2000). Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 342, 1778-1785.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews* 85, 1093-1129.
- Starr, R., and Offer, G. (1971). Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS letters* 15, 40-44.
- Szeto, H.H. (2014). First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol* 171, 2029-2050.

- Tadamura, E., Kudoh, T., Hattori, N., Inubushi, M., Magata, Y., Konishi, J., Matsumori, A., Nohara, R., Sasayama, S., Yoshibayashi, M., and Tamaki, N. (1998). Impairment of BMIPP uptake precedes abnormalities in oxygen and glucose metabolism in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 39, 390-396.
- Tardiff, J.C., Carrier, L., Bers, D.M., Poggesi, C., Ferrantini, C., Coppini, R., Maier, L.S., Ashrafian, H., Huke, S., and van der Velden, J. (2015). Targets for therapy in sarcomeric cardiomyopathies. *Cardiovascular research* 105, 457-470.
- Tardiff, J.C., Hewett, T.E., Palmer, B.M., Olsson, C., Factor, S.M., Moore, R.L., Robbins, J., and Leinwand, L.A. (1999). Cardiac troponin T mutations result in allele-specific phenotypes in a mouse model for hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* 104, 469-481.
- Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J.M., Wolf, C.M., Kim, J.B., Schmitt, J.P., Molkentin, J.D., Norris, R.A., Tager, A.M., Hoffman, S.R., Markwald, R.R., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2010). Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *The Journal of clinical investigation* 120, 3520-3529.
- Terentyev, D., Gyorke, I., Belevych, A.E., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., de Blanco, E.C., Khanna, S., Sen, C.K., Cardounel, A.J., Carnes, C.A., and Gyorke, S. (2008). Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circulation research* 103, 1466-1472.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., and Balaban, R.S. (2000). Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *American journal of physiology. Cell physiology* 278, C423-435.
- Thompson, D.S., Naqvi, N., Juul, S.M., Swanton, R.H., Coltart, D.J., Jenkins, B.S., and Webb-Peploe, M.M. (1980). Effects of propranolol on myocardial oxygen consumption, substrate extraction, and haemodynamics in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *British heart journal* 44, 488-498.
- Tsybouleva, N., Zhang, L., Chen, S., Patel, R., Lutucuta, S., Nemoto, S., DeFreitas, G., Entman, M., Carabello, B.A., Roberts, R., and Marian, A.J. (2004). Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 109, 1284-1291.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552, 335-344.
- Turrens, J.F., Alexandre, A., and Lehninger, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 237, 408-414.
- Unno, K., Isobe, S., Izawa, H., Cheng, X.W., Kobayashi, M., Hirashiki, A., Yamada, T., Harada, K., Ohshima, S., Noda, A., Nagata, K., Kato, K., Yokota, M., and Murohara, T. (2009). Relation of functional and morphological changes in mitochondria to myocardial contractile and relaxation reserves in asymptomatic to mildly symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European heart journal* 30, 1853-1862.
- Vakrou, S., and Abraham, M.R. (2014). Hypertrophic cardiomyopathy: a heart in need of an energy bar? *Front Physiol* 5.
- Varnava, A.M., Elliott, P.M., Mahon, N., Davies, M.J., and McKenna, W.J. (2001). Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *The American journal of cardiology* 88, 275-279.
- Vassalle, C., Botto, N., Andreassi, M.G., Berti, S., and Biagini, A. (2003). Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coronary artery disease* 14, 213-218.

- Vignier, N., Schlossarek, S., Fraysse, B., Mearini, G., Kramer, E., Pointu, H., Mougenot, N., Guiard, J., Reimer, R., Hohenberg, H., Schwartz, K., Vernet, M., Eschenhagen, T., and Carrier, L. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circulation research* 105, 239-248.
- Viola, H.M., and Hool, L.C. (2017). Auto-regulation in the powerhouse. *Elife* 6.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E.C., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S.K., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J.H., Bers, D.M., and Maier, L.S. (2006). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^{+} channels. *The Journal of clinical investigation* 116, 3127-3138.
- Wagner, S., Rokita, A.G., Anderson, M.E., and Maier, L.S. (2013). Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxidants & redox signaling* 18, 1063-1077.
- Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M.E., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., Belardinelli, L., and Maier, L.S. (2011). Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circulation research* 108, 555-565.
- Watkins, H., Ashrafian, H., and Redwood, C. (2011). Inherited cardiomyopathies. *The New England journal of medicine* 364, 1643-1656.
- Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L., Jarcho, J.A., MacRae, C., McKenna, W.J., Maron, B.J., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1995). Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics* 11, 434-437.
- Wigle, E.D. (1995). Novel insights into the clinical manifestations and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Current opinion in cardiology* 10, 299-305.
- Wilder, T., Ryba, D.M., Wieczorek, D.F., Wolska, B.M., and Solaro, R.J. (2015). N-acetylcysteine reverses diastolic dysfunction and hypertrophy in familial hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 309, H1720-H1730.
- Winegrad, S. (1999). Cardiac myosin binding protein C. *Circulation research* 84, 1117-1126.
- Witjas-Paalberends, E.R., Ferrara, C., Scellini, B., Piroddi, N., Montag, J., Tesi, C., Stienen, G.J., Michels, M., Ho, C.Y., Kraft, T., Poggesi, C., and van der Velden, J. (2014a). Faster cross-bridge detachment and increased tension cost in human hypertrophic cardiomyopathy with the R403Q MYH7 mutation. *The Journal of physiology* 592, 3257-3272.
- Witjas-Paalberends, E.R., Guclu, A., Germans, T., Knaapen, P., Harms, H.J., Vermeer, A.M., Christiaans, I., Wilde, A.A., Dos Remedios, C., Lammertsma, A.A., van Rossum, A.C., Stienen, G.J., van Slegtenhorst, M., Schinkel, A.F., Michels, M., Ho, C.Y., Poggesi, C., and van der Velden, J. (2014b). Gene-specific increase in the energetic cost of contraction in hypertrophic cardiomyopathy caused by thick filament mutations. *Cardiovascular research* 103, 248-257.
- Witt, C.C., Gerull, B., Davies, M.J., Centner, T., Linke, W.A., and Thierfelder, L. (2001). Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. *The Journal of biological chemistry* 276, 5353-5359.
- Xie, L.-H., Chen, F., Karagueuzian, H.S., and Weiss, J.N. (2009). Oxidative Stress-Induced Afterdepolarizations and Calmodulin Kinase II Signaling. *Circulation research* 104, 79-86.
- Xu, L., Eu, J.P., Meissner, G., and Stamler, J.S. (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279, 234-237.
- Yang, K.C., Kyle, J.W., Makielski, J.C., and Dudley, S.C., Jr. (2015). Mechanisms of sudden cardiac death: oxidants and metabolism. *Circulation research* 116, 1937-1955.
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., and Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 6-20.

- Zhang, M., Perino, A., Ghigo, A., Hirsch, E., and Shah, A.M. (2013). NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? *Antioxidants & redox signaling* 18, 1024-1041.
- Zhao, K., Zhao, G.M., Wu, D., Soong, Y., Birk, A.V., Schiller, P.W., and Szeto, H.H. (2004). Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *The Journal of biological chemistry* 279, 34682-34690.
- Zima, A.V., and Blatter, L.A. (2006). Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular research* 71, 310-321.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* 94, 909-950.

7. Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen, die mich während meiner Arbeit an der vorliegenden Dissertation unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack für die Auswahl und Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit, sowie seine allzeit bestehende Betreuung und seine außerordentliche Fähigkeit, Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit zu wecken. All das hat die hier vorliegende Arbeit erst ermöglicht und meinen Blick für wissenschaftliche Arbeit gefördert, was meine berufliche Zukunft sehr bereichern wird. Auch Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm gilt großer Dank meinerseits. So durfte ich die sowohl die Möglichkeit der Durchführung meiner Experimente in seinem kardiologischen Forschungslabor, als auch seine engagierte Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses genießen.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der Ionoptix-Anlage und seine große, immense Hilfsbereitschaft bei Fragen zur Durchführung und Auswertung der Experimente. Ebenso gilt großer Dank Herrn Dr. rer. nat. Alexander Nickel für die fundierte Betreuung im Rahmen der mitochondrialen Atmungsmessungen und deren Methodik bzw. Auswertung. Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, namentlich Michelle Gulentz und allen anderen Doktorandinnen und Doktoranden sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der kardiologischen Forschungslaboratorien für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund Herrn Dr. rer. nat. Mathias Hohl, der mich vor allem bei der Niederschrift dieser Dissertation bedingungslos unterstützte. Schließlich möchte ich an dieser Stelle meiner Familie für ihren Rückhalt und unendliche Liebe danken. Ohne sie wäre diese Promotion niemals möglich gewesen.

Der tiefste Dank gilt allerdings meinem Vater Herrn Dr. med. Wolfgang Bay. Er hat bis zuletzt meine Disseration sehr gefördert und stand mir dabei immer zur Seite. Ich möchte ihm diese Arbeit in stillem Gedenken und von ganzem Herzen her widmen.

8. Publikationen und Vorträge

Publikationen und Vorträge

06/2013 *“Myosin binding protein C mutation in hypertrophic cardiomyopathy provokes mitochondrial H₂O₂ by a mismatch between ADP-induced oxidation and Ca²⁺-induced regeneration of NADPH”*

J. Bay, M. Kohlhaas, F. Flenner, F. Friederich, L. Carrier, T. Eschenhagen, C. Maack (Universitätsklinik Homburg/Saar, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf)

Vortrag auf der 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim.

08/2013 *“Intracellular Na⁺ and cardiac metabolism”*

J. Bay, M. Kohlhaas, C. Maack (Universitätsklinik Homburg/ Saar)

Erstautorenschaft, Wissenschaftliches Review unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christoph Maack, Journal of Molecular and Cellular Cardiology (Bay et al., 2013).

10/2013 *“Increased mitochondrial H₂O₂ formation in hypertrophic cardiomyopathy with mutated myosin binding protein C”*

J. Bay, M. Kohlhaas, F. W. Friedrich, F. Flenner, L. Carrier, T. Eschenhagen, C. Maack (Universitätsklinik Homburg/Saar, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf)

Basic Science Poster und Vortrag auf der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Dresden.

01/2014 *“Imbalance between mitochondrial ADP and Ca^{2+} triggers NAD(P)H oxidation and H_2O_2 emission in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy”*

M. Kohlhaas, F. Flenner, J. Bay, F. W. Friedrich, L. Carrier, T. Eschenhagen, C. Maack (Universitätsklinik Homburg/Saar, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf)

Postervortrag auf dem Heart Failure Association Winter Meeting in Les Diablerets, Schweiz, 22-25, 2014. Erschienen im European Journal of Heart.

08/2016 *“Neonatal thrombosis: Etiology and associated risk factors”*

S. Meyer, S. Rohr, P. Duppre, J. Bay, L. Gortner, M. Poryo (Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie Homburg/ Saar, Klinik für pädiatrische Kardiologie, Homburg / Saar)

Wissenschaftlicher Artikel, erschienen im Journal of Pediatrics (Meyer et al., 2016).

05/2017 *“Developing a better and practical definition of bronchopulmonary dysplasia”*

S. Meyer, A. R. Franz, J. Bay, L. Gortner (Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie Homburg/ Saar, Klinik für Kinderheilkunde Tübingen, Medizinische Universität Wien in Österreich)

Wissenschaftlicher Artikel, erschienen im Acta Pædiatrica (Meyer et al., 2017b).

07/2017 *“Episodes of hypo- and hypercapnia in a cohort of mechanically ventilated VLBW infants: the role of adequate staffing”*

M. Röhr, M. Poryo, J. Bay, L. Gortner, S. Meyer (Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie Homburg/ Saar, Klinik für pädiatrische Kardiologie, Homburg / Saar).

Wissenschaftlicher Artikel, erschienen in der Wiener medizinischen Wochenschrift (Rohr et al., 2017).

07/2017 *“Up-date on the NeoVitaA Trial: Obstacles, challenges, perspectives, and local experiences”*

S. Meyer, J. Bay, L. Gortner (Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie Homburg/ Saar).

Wissenschaftlicher Artikel zur NeoVitaA Studie, erschienen in der Wiener medizinischen Wochenschrift (Meyer et al., 2017c).

10/2017 *“Short-, medium-, and long-term assessment of pulmonary dysfunction in extremely low birth weight neonates”*

S. Meyer, A. R. Franz, J. Bay, L. Gortner (Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie Homburg/ Saar, Klinik für Kinderheilkunde Tübingen, Medizinische Universität Wien in Österreich)

Wissenschaftlicher Artikel zur NeovitaA Studie, erschienen im Journal of Pediatrics (Meyer et al., 2017a).

9. Lebenslauf

Johannes Maximilian Bay

Persönliche Daten

Anschrift: Paracelsusstrasse 36, 66424 Homburg
 Geburtsdatum, -ort: 23.10.1987 in Homburg/ Saar
 Familienstand: ledig
 Familie: Dr. Wolfgang Bay, Arzt †
 Christiane Bay, geb. Harbauer, Krankenschwester
 einen jüngeren Bruder und eine jüngere Schwester
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Konfession: evangelisch
 Telefonnummer: 06841/ 79259 und 0160/ 4643251
 E-Mail: johannes.bay@uks.eu
 Sprachliche Kenntnisse: Englisch und Französisch

Ausbildung

10/2008 - 12/2014 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes
 • 10/2010 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,5
 • 11/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
 • 12/2014 Bestandenes Staatsexamen, Gesamtnote: 2,16

 08/2007 - 09/2008 Zivildienst und anschließende Vollzeitbeschäftigung als
 Rettungssanitäter an der DRK Rettungswache Homburg

 08/1998 - 07/2007 Saarpfalz-Gymnasium, Homburg
 Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,7

 08/1994 - 07/1998 Grundschule Luitpold, Homburg-Erbach

Praktisches Jahr

08/2013 - 12/2013	Chirurgie, Spital Lachen, Schweiz
12/2013 – 04/2014	Innere Medizin, Universitätsklinik Homburg
04/2014 – 07/2014	Pädiatrie, Universitätsklinik Homburg

Famulaturen

08/2011 - 09/2011	Kardiologie der SHG Kliniken Völklingen
08/2012 - 09/2012	Innere Medizin, Uniklinik Homburg
09/2012 - 12/2012	Innere Notaufnahme, Uniklinik Homburg
03/2013 - 04/2013	Anästhesie/Intensivmedizin, Sana Klinikum Berlin-Lichtenberg

Ausbildung

10/2007	Abgeschlossene Berufsausbildung zum Rettungssanitäter, Rettungsdienstschule St. Ingbert
---------	---

Beruf

Seit 06/2015	Assistenzarzt für Pädiatrie an der Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie, Universitätsklinik Homburg
06/2015	Stationsarzt der Station für Allgemeinpädiatrie KK-07
07/2015 - 09/2016	Stationsarzt der neonatologischen Station KK-02
10/2016 – 03/2018	Stationsarzt der neuropädiatrischen Station KK-04
Seit 04/2018	Arzt in der Gemeinschaftspraxis für Kinder- und Jugendmedizin Dres. med. Richter, Reichert, Wahlen & Stierkorb, Homburg

Seit 02/2012	Mitglied der Forschungsgruppe Maack, Heisenberg Professur für kardiovaskuläre Physiologie und Bioenergetik, Innere Medizin III der Universitätsklinik Homburg
--------------	---

Seit 07/ 2015	<p>Studienarzt und Mitglied der NeoVitaA Studiengruppe.</p> <p>Frühe, postnatale, zusätzliche orale Hochdosis Vitamin-A-Supplementierung gegenüber Placebo über 28 Tage zur Prävention der bronchopulmonalen Dysplasie oder des Todes bei extrem Frühgeborenen</p> <p>DFG-geförderte multizentrische Studie in Deutschland, Österreich und der Schweiz. Prospektiv, doppelblind, Placebo-kontrolliert, Phase III (Meyer et al., 2014).</p>
---------------	--

Seit 06/2015	Dozent für die studentische Lehre der Kinderheilkunde an der Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie, Universitätsklinik Homburg. Untersuchungskurse und Seminare für Blockpraktikanten, PJ-Studenten und das Wahlfach Pädiatrie.
--------------	--